DER EINFLUSS VERSCHIEDENER PURIN- UND PYRIMIDIN-DERIVATE AUF DIE DURCH ALLOPURINOL INDUZIERTE OROTACIDURIE

Brigitte Juliana Große

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

DER EINFLUSS VERSCHIEDENER PURIN- UND PYRIMIDIN-DERIVATE AUF DIE DURCH ALLOPURINOL INDUZIERTE OROTACIDURIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von:

Brigitte Juliana Große
geb. Baumüller
aus München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Gröbner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

M E I N E N L I E B E N E L T E R N

I N D A N K B A R K E I T G E W I D M E T

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0021

G L I E D E R U N G

		Seite
1.	E I N L E I T U N G	1
2.	A L L G E M E I N E R T E I L	3
2.1.	Purinstoffwechsel	3
2.1.1.	Biosynthese und Abbau	3
2.1.2.	Regulation	8
2.1.3.	Reutilisation	10
2.2.	Pyrimidinstoffwechsel	12
2.2.1.	Biosynthese	12
2.2.2.	Abbau	15
2.2.3.	Regulation	17
2.2.4.	Reutilisation	19
2.3.	Beeinflussung durch Allopurinol	21
2.3.1.	Purinstoffwechsel	21
2.3.2.	Pyrimidinstoffwechsel	30
3.	E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N	37
3.1.	Problemstellung	37

		Seite
3.2.	Methodik	39
3.2.1.	Versuchspersonen	39
3.2.2.	Diät	41
3.2.3.	Versuchsablauf	46
3.2.4.	Methoden	49
3.2.4.1.	Harnsäure	49
3.2.4.2.	Oxypurine	54
3.2.4.3.	Orotsäure	60
3.2.4.4.	Orotidyl-Decarboxylase	64
3.2.4.5.	Eiweiß	70
3.3.	Ergebnisse	75
4.	D I S K U S S I O N	81
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	90
6.	A N H A N G	93
	Tabellen des Ernährungsversuches Abbildungen	94 bis 108
	Abkürzungsverzeichnis	109
	Literatur	111
	Lebenslauf	129

1. E I N L E I T U N G :

Purin- und Pyrimidinnukleotide sind die Bausteine der Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure. Die Regulationsmechanismen der Stoffwechselwege, die zur Synthese und zum Abbau dieser Nukleotide führen, wurden in zahlreichen biologischen Systemen untersucht. Der menschliche Purinstoffwechsel ist, nicht zuletzt wegen seiner Bedeutung für die Pathogenese und Therapie der Gicht, seit der Jahrhundertwende Gegenstand der Forschung und dadurch recht gut bekannt. Über den Pyrimidinstoffwechsel des Menschen hingegen liegen gründliche Untersuchungen erst aus dem letzten Jahrzehnt vor. Die ersten Ergebnisse stammen aus Untersuchungen der heretitären Orotacidurie und der medikamentös bedingten Orotacidurien. Neuerdings hat man bestimmte Aspekte des Pyrimidinstoffwechsels auch an menschlichen Fibroblasten und Erytrozyten geprüft.

Zwischen der Bildung von Pyrimidin- und Purinnukleotiden müssen enge Beziehungen bestehen, da beide zum größten Teil in annähernd gleichen äquimolekularen Mengen in die Synthese der Nukleinsäure eingehen. Zur Frage, wie diese Beziehungen reguliert werden, gibt es nur eine vorläufige Antwort. Möglicherweise spielt 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat eine wichtige

Rolle. So kann eine erhöhte intrazelluläre Konzentration dieser Verbindung zu einer vermehrten Harnsäureproduktion führen (78). Umgekehrt hemmt Orotsäure die Purinsynthese de novo (63, 46). Diese Wirkung beruht auf einer intrazellulären Verminderung von 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat durch Phosphorylierung der Orotsäure. Die weitere Untersuchung der hereditären und der medikamentös induzierten Orotacidurie dürfte ebenfalls Einblicke in die Verknüpfung von Purin- und Pyrimidinstoffwechsel geben (30).

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Purinstoffwechsel

2.1.1. Purinbiosynthese und Abbau

In den fünfziger Jahren bereits wurde die Herkunft der einzelnen am Aufbau des Puringerüstes beteiligten Atome geklärt.

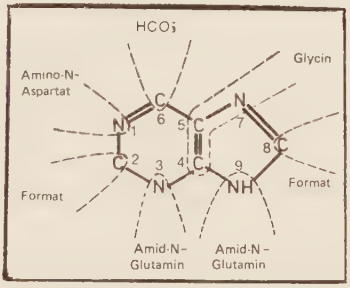


Abb. 1:
Herkunft der C-Atome
und N-Atome im
Purinkern
(nach G. Löffler, 1975)

Trotz dieser Erkenntnis wurde der Mechanismus der Purinbiosynthese erst verständlich, als sich herausstellte, daß nicht zuerst, wie erwartet, der Purinring synthetisiert wird und danach die N-glykosidische Bindung mit Ribose geknüpft wird. Die Biosynthese erfolgt vielmehr von dem ersten Schritt an in Form von Phosphoribosylverbindungen,

welche wesentlich reaktionsfähiger sind als die Bausteine der Purinbasen alleine (53).

Die stufenweise Synthese des Purinskelettes erfolgt durch zehn enzymatische Reaktionsschritte (Abb. 3). Eine Schlüsselstellung im Purinstoffwechsel nimmt das 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) ein.

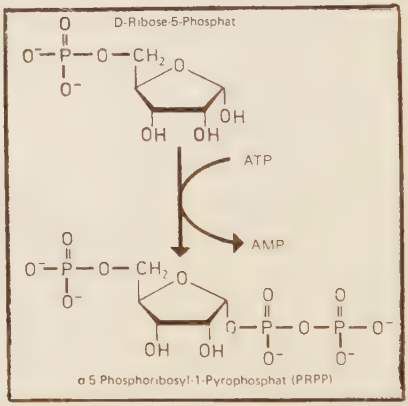


Abb. 2:
Phosphorylierung von D-Ribose-5-Phosphat (nach G.Löffler,1975)

Diese Verbindung ist durch zwei verschiedene Reaktionen an der Synthese von Purinnukleotiden beteiligt: Erstens stellt es gemeinsam mit Glutamin die Ausgangssubstanz für die Purinsynthese dar, und zweitens bildet es aus bereits

vorhandenen, teilweise durch die Nahrung zugeführten Purinbasen Purinnukleotide. Für die Synthese von PRPP ist Ribose-5-Phosphat notwendig, welches über den Phosphogluconsäure-Shunt aus Glucose, als Produkt des nicht oxidativen Abbaues von Fructose-6-Phosphat, oder als Endprodukt des Uronsäurezyklus entstehen kann. Durch Einwirkung der Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase (PRPP-Synthese) entsteht aus Ribose-5-Phosphat unter ATP-Verbrauch das PRPP.

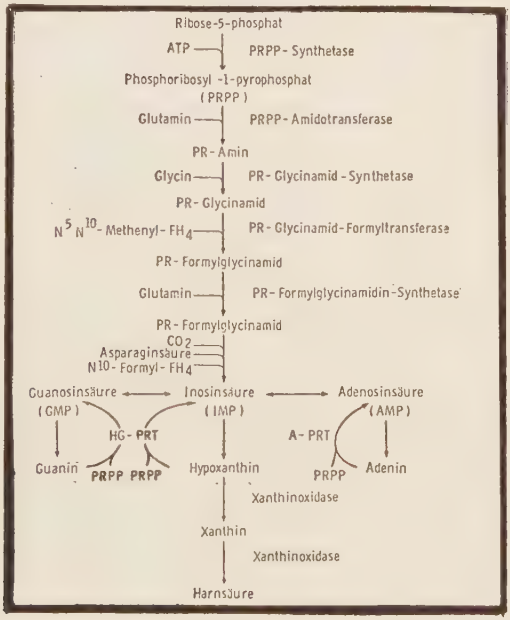


Abb. 3:
Purinbiosynthese
(Stoffwechsel)
(nach M.M. Müller
1975)

Der nächste Reaktionsschritt wird von der Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (PRPP-Amidotransferase) katalysiert: Der Pyrophosphatrest des PRPP wird durch die Aminogruppe des Glutamins ersetzt, und es entstehen das 5-Phosphoribosyl-1-amin und Glutaminsäure. Diese irreversible Reaktion wird durch die Purinmononukleotide gehemmt (77).

Eine zweite Möglichkeit der Synthese von Phosphoribosylamin durch die direkte Reaktion von Ammoniak mit Ribose-5-Phosphat wird zur Zeit diskutiert. Phosphoribosylamin reagiert im dritten Reaktionsschritt unter Anwesenheit von ATP mit Glycin zum Glycinamid-Ribonukleotid. Nach Formylierung und nochmaliger Reaktion mit Glutamin entsteht das Formylglycinamid-Ribonukleotid. Durch vier weitere Reaktionen, in denen Asparaginsäure, CO_2 und ein Formylrest benötigt werden, kommt es zum Ringschluß und zur Bildung von Inosinsäure (IMP). Das so gebildete IMP kann als Stammsubstanz für die anderen Purinnukleotide aufgefaßt werden, da es sowohl zu Adenosinsäure (AMP) als auch zu Guanosinsäure (GMP) umgewandelt werden kann. AMP und GMP können weiter zu den entsprechenden Triphosphaten phosphoryliert werden, die wichtige Coenzyme für viele Reaktionen und Bausteine der Nukleinsäuren darstellen.

Aus den Mononukleotiden entstehen unter Einwirkung spezifischer Nukleodidasen die Purinnukleoside, die dann durch die Purinnukleosid-Phosphorylase in Ribose-1-Phosphat und die entsprechenden freien Basen gespalten werden. Beim Menschen entstehen dabei hauptsächlich Hypoxanthin und Guanin, wobei letzteres durch die Guanase zu Xanthin desaminiert wird. Durch die Xanthinoxidase wird Hypoxanthin zu Xanthin und dieses weiter zu Harnsäure oxidiert (57, 25).

2.1.2. Regulation der Purinbiosynthese

Die Regulation der Purinbiosynthese wurde vor allem von Wyngaarden (77, 79) untersucht. Seine Arbeiten und die anderer Autoren (13, 36, 57) zeigen, daß PRPP-Amidotransferase (Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase) das regulatorische Enzym der Purinbiosynthese ist. Es wird durch Adenyl- und Guanylsäure gehemmt.

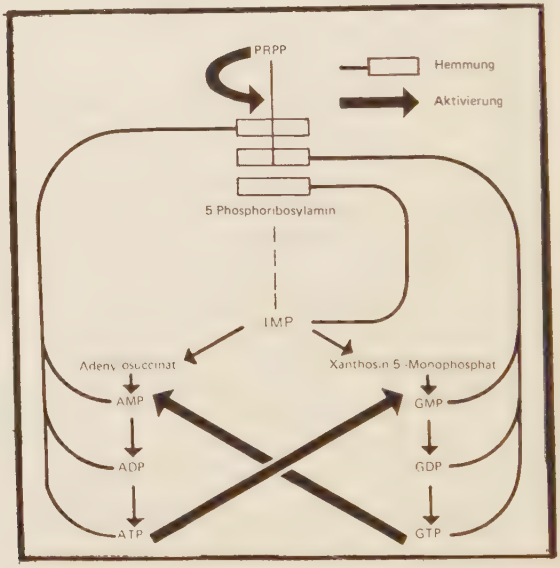


Abb. 4: Regulation der Purinbiosynthese (Abb. nach G. Löffler 1975)

Aus der Tatsache, daß die Hemmwirkungen additiv sind, kann auf verschiedene Bindungsstellen der jeweiligen Nukleotide am Enzym geschlossen werden. Durch diese allosterische Hemmung wird die Purinbiosynthese gedrosselt, wenn ausreichende Mengen an Purinnukleotiden vorhanden sind. - Ein weiterer Kontrollmechanismus befindet sich auf der Stufe der Umwandlung von IMP in AMP bzw. GMP. Für die Bildung von Adenylsuccinat aus IMP ist GTP als Cofaktor notwendig. Dies hat zur Folge, daß bei Vorliegen hoher Konzentrationen von GTP die AMP-Bildung gefördert wird. Das umgekehrte gilt für die GMP-Biosynthese aus IMP, die auf der Stufe der Umwandlung von Xanthosin-Monophosphat in GMP ATP-abhängig verläuft (53).

2.1.3. Reutilisation von Purinbasen

Durch den intrazellulären Abbau von Nukleinsäuren sowie durch enterale Resorption sammeln sich beträchtliche Mengen von Purin- bzw. Pyrimidinbasen an. Ein Teil hiervon wird zwar zu den entsprechenden Endprodukten des Purin- bzw. Pyrimidinabbaus umgewandelt, daneben kommen jedoch in allen bisher untersuchten Zellen Enzyme vor, die eine Reutilisation der Purin- bzw. Pyrimidinbasen ermöglichen.

Für die Reutilisation von Adenin, Hypoxanthin und Guanin stehen zwei Enzyme zur Verfügung. Durch Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (APRT) wird Adenin in AMP verwandelt. Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Tranferase (HGPRT) ist für die Wiedereinführung von Hypoxanthin und Guanin in den Nukleotidstoffwechsel verantwortlich.

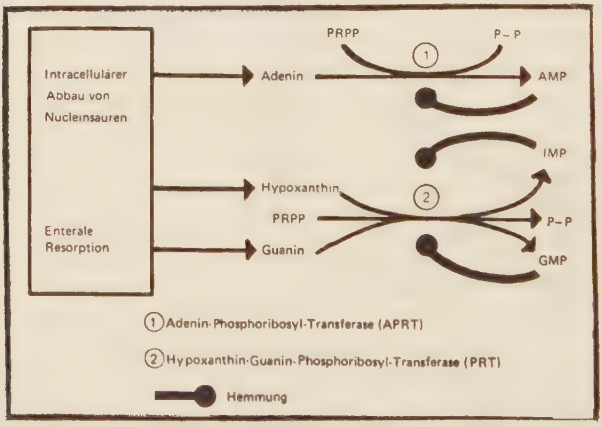


Abb. 5:
Reutilisation von Purinbasen (Abb. nach Löffler, 1975)

In Anbetracht der außerordentlichen biologischen Bedeutung der Purinnukleotide muß gewährleistet sein, daß der Zelle unter allen Umständen ausreichende Mengen der einzelnen Vertreter dieser Substanzen zur Verfügung stehen. Zu diesem Zwecke dient ein aus insgesamt 17 Enzymen bestehendes System, mit dessen Hilfe es gelingt, Purine, Purinnukleoside und Purinnukleotide vollständig ineinander überzuführen. Da auf diese Weise eine gewisse Unabhängigkeit der Purinnukleotidbildung von der Biosynthesegeschwindigkeit aus den Grundbausteinen gewährleistet wird, ist die biologische Bedeutung dieses "enzymatischen Netzwerkes" beträchtlich (53, 58).

2.2. Pyrimidinstoffwechsel

2.2.1. Pyrimidinbiosynthese

Pyrimidinnukleotide können entweder de novo, ausgehend von Carbamylphosphat (ATP, CO_2, Glutamin ⟶ Carbamylphosphat), synthetisiert oder aus Ribonukleosiden wie Uridin oder Cytidin durch Reutilisation aufgebaut werden.

Der erste Schritt dieser de novo-Synthese führt beim Menschen mit Hilfe des Enzyms Carbamylphosphat-Synthetase zur Bildung von Carbamylphosphat aus den Substanzen Adenosin-5-Triphosphat, Kohlendioxid und Glutamin.

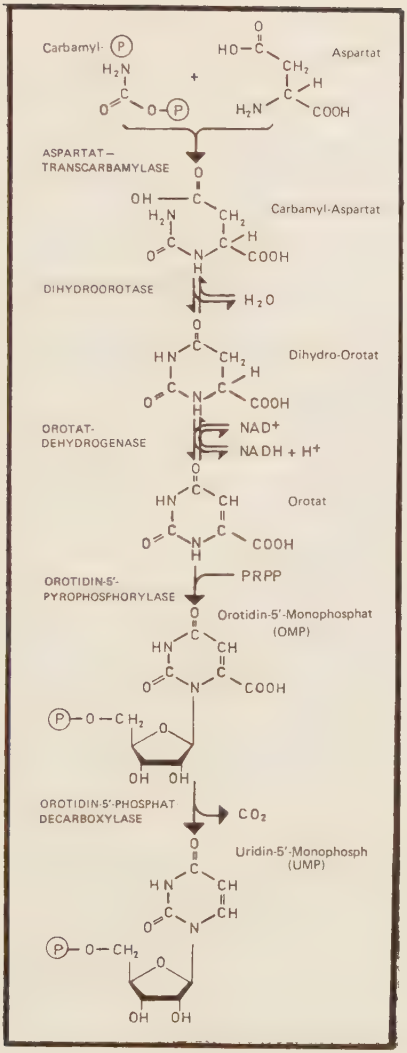


Abb. 6:
Pyrimidinbiosynthese (nach G. Löffler, 1975)

Nach zahlreichen Untersuchungen (48, 39) gibt es zweierlei Arten von Carbamylphosphat-Synthetasen. Das eine Enzym, welches in den Mitochondrien der Leber gefunden wird (CAPS 1) benutzt Ammoniak als Stickstoffquelle und scheint für die Zitrullinsynthese als Teil des Harnstoffzyklus verantwortlich zu sein, während bei der anderen Carbamylphosphat-Synthetase (CAPS 2) vorwiegend Glutamin, aber auch bei Überangebot von NH_3 Ammoniak als Stickstoffdonator dienen können. Nach Levenburg, 1962 (52), Hager und Jones, 1965 (34), Ito und Mitarbeiter, 1970 (38) scheint die CAPS 2 für die Pyrimidinsynthese verantwortlich zu sein.

Aus Carbamylphosphat entsteht unter Mitwirkung von Aspartat in einem zweiten Schritt das Carbamylaspartat. Als nächstes wird dehydriert zu Dihydrooratat, wobei der Pyrimidinring geschlossen wird. Anschließend erfolgt die Oxidation zu Orotsäure. Die beiden Reaktionen werden durch die Enzyme Dihydroorotase und Orotat-Dehydrogenase katalysiert.

Aus dem eigentlichen Endprodukt der Pyrimidinsynthese, der Orotsäure, entsteht mittels Orotidin-5-Pyrophosphorylase und dem Substrat Phosphoribosyl-Pyrophosphat Orotidin-5-Monophosphat (OMP), welches unter Abspaltung von CO_2 in Uridin-5-Monophosphat (UMP) übergeht (30).

2.2.2. Pyrimidinabbau

Der im wesentlichen in der Leber stattfindende Abbau der Pyrimidinbasen erfolgt nach dem in Abb. 7 dargestellten Mechanismus: (20)

Ausgehend vom Uracil (Cytosin wird zu Uracil desaminiert) und Thymin erfolgt die Ringspaltung in einem dreistufigen Mechanismus. Zunächst kommt es durch Reduktion zu Dihydrouracil bzw. Dihydrothymin. Durch Wasseranlagerung kann nun der Sechsring zwischen den Positionen 3 und 4 gespalten werden. Es entsteht Ureidopropionat bzw. Ureidoisobutyrat aus Dihydrouracil bzw. Dihydrothymin. Von beiden Verbindungen kann CO_2 und NH_3 abgespalten werden, so daß ß-Alanin bzw. ß-Aminoisobutyrat (ß-AIBA) entsteht, welches zu Acetat bzw. Proprionat, NH_3 und CO_2 abgebaut werden kann.

Während ß-Alanin in mehreren Verbindungen des Stoffwechsels enthalten ist (Carnosin, Anserin, Pantothensäure, Co-A), stammt ß-AIBA zum größten Teil, möglicherweise ausschließlich, aus dem Abbau von Thymin und stellt somit einen wichtigen Parameter des Pyrimidinstoffwechsels dar (53).

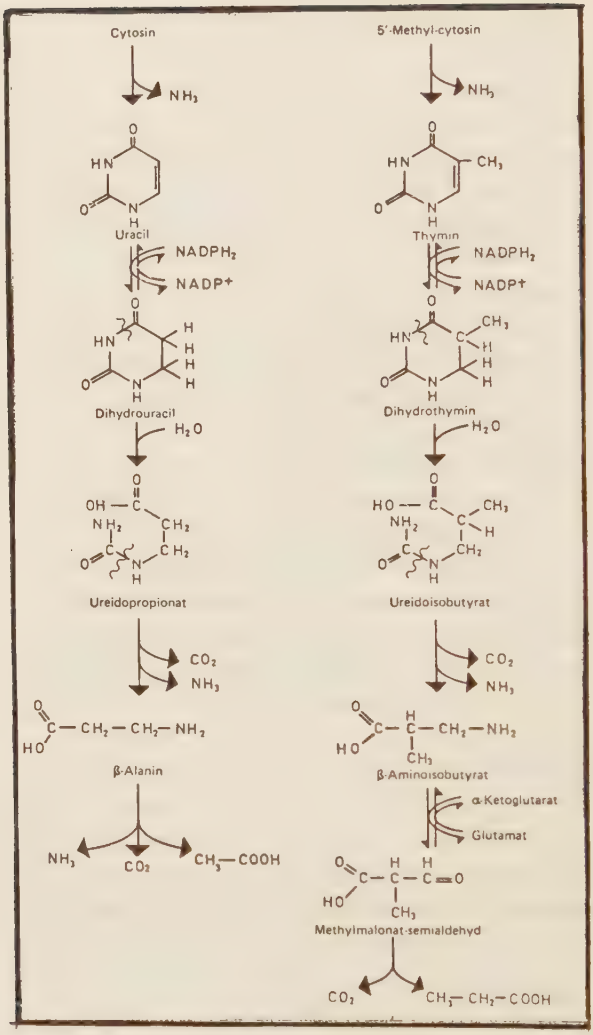


Abb. 7
Der Abbau der Pyrimidinbasen (nach G.Löffler, 1975)

2.2.3. Regulation des Pyrimidinstoffwechsels

Auch die Synthese der Pyrimidine wird von der Zelle außerordentlich genau reguliert, was in Anbetracht des für die Biosynthese notwendigen Energiebedarfs verständlich ist. Das geschwindigkeitsregulierende Enzym ist bei den Säugern die Glutamin bevorzugende Carbamylphosphat-Synthetase (CAPS 2) (91, 39, 38, 15).

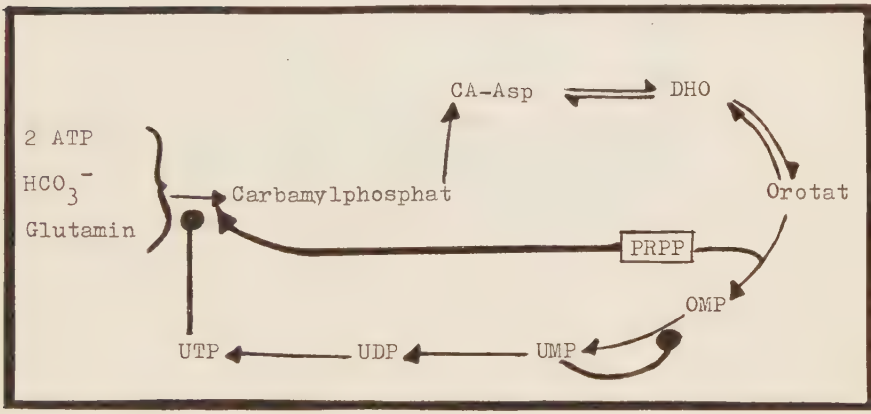


Abb. 8:
Regulation der Pyrimidinbiosynthese
(modifiziert nach G. Löffler, 1975)

Aus energetischen Gründen ist es sinnvoll (ATP-Verbrauch), daß die Regulation der Pyrimidinsynthese durch Aktivitätsänderungen des Enzyms erfolgt. Das vorläufige Endprodukt der Pyrimibiosynthese, Uridin-Triphosphat (UTP), ist in physiologischen Konzentrationen ein wirksamer Hemmstoff der Carbamylphosphat-Synthetase 2, die andererseits durch Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) aktiviert wird. Auf diese Weise ist gewährleistet, daß bei ausreichenden Mengen von UTP die Biosynthese von Pyrimidinnukleotiden gebremst und bei einem Anstieg des PRPP-Spiegels wieder beschleunigt werden kann (53).

Weitere Kontrollmöglichkeiten des Pyrimidinstoffwechsels betreffen das Enzym Dihydroorotase sowie die Orotidyl-Decarboxylase (ODC), die wiederum durch Uridin-5-Monophosphat gehemmt wird (30).

2.2.4. Reutilisation von Pyrimidinbasen

Es gilt als gesichert, daß die Möglichkeit zur Reutilisation von Nukleosiden und Basen nicht nur für die Purin-, sondern auch für die Pyrimidinabkömmlinge existiert (53). Pyrimidinnukleotide kommen in den Nukleinsäuren etwa in gleichen Mengen vor wie Purinnukleotide, ebenso entspricht sich die tägliche Biosyntheserate (400-700 mg/Tag).

Die Pyrimidinribonukleosid-Monophosphate und Pyrimidindesoxyribonukleosid-Derivate können durch verschiedene Enzyme zu Di- und Triphosphaten phosphoryliert werden (Abb. 9). So wird Uridin-5-Monophosphat zu Uridin-5-Diphosphat und Uridin-5-Triphosphat umgewandelt. Aus der letzten Verbindung kann Cytidin-5-Triphosphat gebildet werden. Andererseits können Uridin- und Cytidin-5-Monophosphat eben auch direkt aus Pyrimidinbasen und Nukleosiden entstehen (30).

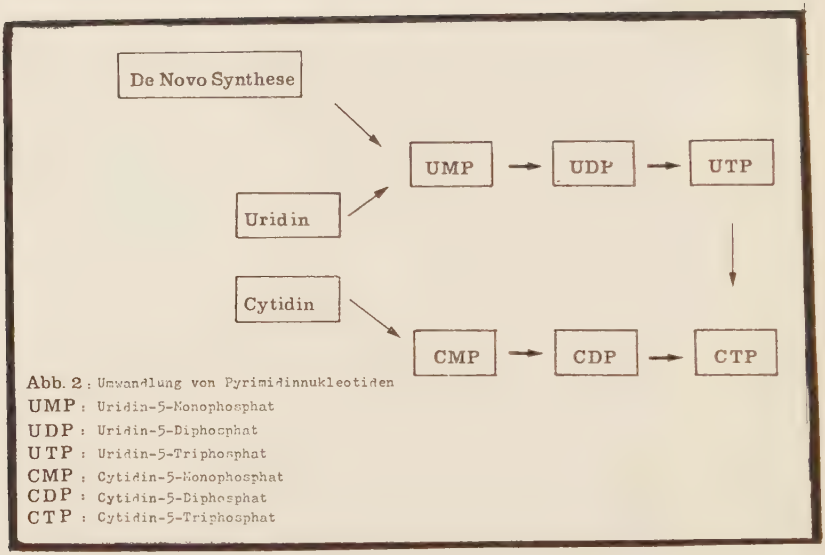


Abb. 9:
Reutilisation bzw. Umwandlung von Pyrimidin-nukleotiden
(nach W. Gröbner, 1975)

2.3. Beeinflussung durch Allopurinol

2.3.1. Purinstoffwechsel

Eine Vielzahl von Regelmechanismen greifen ineinander, um das Angebot von Purinstoffen dem Bedarf der Zelle durch die Geschwindigkeit der Biosynthese, Reutilisation und Abbau anzupassen. Es ist nicht verwunderlich, daß ein solch kompliziertes System Störungen ausgesetzt sein kann und diese durch die allgemeine Bedeutung der Purinnukleotide zu beträchtlichen Störungen des gesamten Zellstoffwechsels führen können. Neben einer Hemmung der Purinnukleotidbiosynthese durch Metabolitenanaloge ist hier besonders die Überproduktion von Purinukleotiden zu nennen. Jede Überproduktion von Purinnukleotiden wird gefolgt von einer Zunahme der Abbaugeschwindigkeit und damit der Harnsäureproduktion. Eine Zunahme der Serumkonzentration über die Löslichkeitsgrenze (6,5 - 7,0 mg%, (84)) wird als Hyperurikämie bezeichnet, die asymptomatisch bleiben oder zum klinischen Bild der Gicht führen kann. Bei dieser außerordentlich häufigen Stoffwechselkrankheit unterscheidet man grundsätzlich zwischen primärer und sekundärer Hyperurikämie bzw. Gicht. Über die Art der der primären Hyperurikämie zugrundeliegenden angeborenen Stoffwechselstörungen besteht noch

Meinungsverschiedenheit. So wird eine Theorie der Überproduktion von Harnsäure einer Ausscheidungstheorie gegenübergestellt, die besagt, daß eine funktionelle Schwäche der Niere Ursache der Hyperurikämie sei (27).

Tab. 1:
Ursachen der primären Hyperurikämie (nach W.Gröbner,1971)

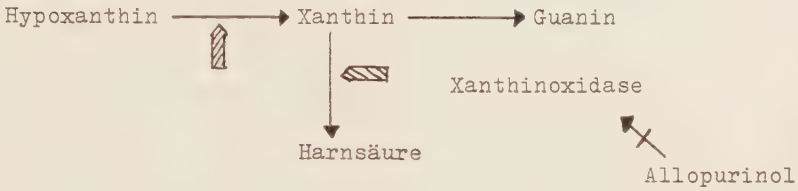
	U r s a c h e n
Überproduktion von Harnsäure 2 %	1. Enzymaktivität ↑ der Gutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase 2. Substratkonzentration ↑ an a) Glutamin b) 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat 3. Umsatz (Jones et al. 1962) ↑ des 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphates 4. Enzymaktivität ↓ verminderte oder fehlende Aktivität der HGPRT - (Seegmüller J.E.1967) LESCH-NYHAN-SYNDROM
Hemmung der renalen Harnsäureausscheidung 98 %	Eine Verminderung der tubulären Harnsäuresekretion

Die sekundäre Hyperurikämie ist Folge von Erkrankungen, bei denen durch vermehrten Zelluntergang ein Übermaß an Purinbasen zum Abbau gelangen, oder aber Folge einer Nierenerkrankung bei verminderter Ausscheidung oder Anwendung bestimmter Medikamente.

Tab. 2:
Ursachen der sekundären Hyperurikämie (nach Kelley et al. 1973)

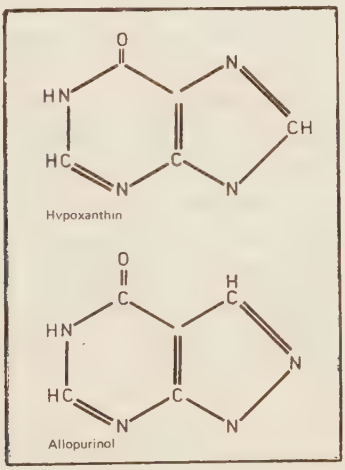
Überproduktion durch Zunahme des Nukleinsäure-Umsatzes	Psoriasis (abhängig von der Krankheitsaktivität) Lymphatische und myeloische Leukämien Chron. hämolyt. Anämien
Überproduktion durch gesteigerte de novo-Synthese	Glucose-6-Phosphatase Mangel
Verminderung der renalen Ausscheidung	Chron. Nierenerkrankungen Bleivergiftung Berylliumvergiftung Alkoholzufuhr Schwangerschaftstoxikose Diabetische Ketose Dehydratation Behandlung mit Salizylaten (in niedrigen Dosen)

Die Bedeutung von Allopurinol liegt in seiner Fähigkeit, die Bildung von Harnsäure zu hemmen.



Im Gegensatz zu den Uricosurica (z. B. Probenecid, Sulfinpyrazon, Benzbromaron), welche die Rückresorption von Harnsäure hemmen, greift Allopurinol auf eine ganz andere Weise hemmend in den Purinstoffwechsel ein. Allopurinol ist ein Strukturanalogon des Hypoxanthins und wirkt als kompetitiver Hemmstoff der Xanthinoxidase.

Abb. 10:



Infolgedessen kommt es unter Allopurinol zu einem Abfall der Serumharnsäure und renalen Harnsäureausscheidung bei gleichzeitigem Anstieg der Ausscheidung von Hypoxanthin und Xanthin im Urin. Bei den meisten Patienten wird jedoch die Verringerung der renalen Harnsäureausscheidung nicht durch die vermehrte Oxypurinelimination ersetzt (66, 16, 68, 35, 88). Dies legte die Vermutung nahe, daß Allopurinol auch zu einer Beeinflussung der Purinsynthese de novo führt. In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung von Emmerson (19), daß die Verminderung der Gesamtpurinausscheidung unter Allopurinol mit einem verminderten Einbau von markiertem Glycin in die Urinharnsäure verbunden ist. Untersuchungen am Menschen und mit Taubenleber ließen mehrere Mechanismen zur Erklärung der Hemmung der Purinsynthese de novo durch allopurinol annehmen.

1. Das Ribonukleotid des Allopurinols hemmt in vitro die 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase sowohl der Taubenleber als auch des Menschen (55, 36). Dieses Enzym ist geschwindigkeitsbestimmend für die Purinsynthese de novo. Auf einer Hemmung dieser 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase durch Allopurinolribonukleotid könnte beim Menschen auch in vivo die Beeinflussung der Purinsynthese de novo während einer Allopurinolbehandlung beruhen.

2. Allopurinol führt durch Hemmung der Xanthinoxydase zu einer vermehrten Bildung von Inosinsäure aus Hypoxanthin. Inosin-5-Monophosphat sowie die daraus entstehenden Adenin- und Guaninnukleotide sind allosterische Inhibitoren der 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotranferase (13, 36, 45).
Obgleich beim Menschen in vivo ein solcher Mechanismus nicht bewiesen ist, wird er durch die Beobachtung, daß Allopurinol bei Mäusen die Reutilisation von Hypoxanthin und Xanthin für die Nukleinsäuresynthese steigert, wahrscheinlich gemacht (61, 62).

3. Fox und Mitarbeiter (21) konnten zeigen, daß nach oraler Einnahme Allopurinol, nicht jedoch Oxypurinol, innerhalb von 3 - 5 Stunden zu einem Abfall der 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphatkonzentration in den Erythrocyten führt. Die Autoren erklären diesen Abfall mit der Bildung von Allopurinolribonukleotid. Es wäre damit vorstellbar, daß die vermehrte Umwandlung von Allopurinol oder Hypoxanthin zu den entsprechenden Ribonukleotiden zu einer Reduktion der intacellulären Konzentration von 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat, einem Substrat der 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase, und auf diesem Wege zu einer verminderten Purinsynthese de novo führt.

Wahrscheinlich läßt sich die Beeinflussung der Purinsynthese de novo während einer Allopurinolbehandlung nicht auf einen einzigen, sondern auf alle drei Mechanismen zurückführen, wobei die quantitative Relevanz noch offen ist. Eine entscheidende Rolle spielt das Enzym Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRTase), das die Ribonukleotidbildung katalysiert. So konnten Kelley und Mitarbeiter (42) zeigen, daß bei Patienten mit verminderter Aktivität dieses Enzyms Allopurinol zu keiner Beeinflussung der Purinsynthese de novo führt.

Auf eine alternative Hypothese zur Erklärung des Purindefizits nach Gabe von Allopurinol wird von Zöllner und Gröbner (88) hingewiesen. Aufgrund ihrer Untersuchungen beeinflußt Allopurinol unterschiedlich die endogene und exogene Harnsäurebildung. Während die Hemmung der endogenen Harnsäuresynthese nur etwa 50 % ausmacht, wird die Harnsäurebildung aus exogenen Purinen durch Allopurinol vollständig unterdrückt. Da nennenswerte Mengen von Xanthinoxydase nur in der Leber und im Dünndarm gebildet werden, könnte die Elimination der exogenen Uratquote auf einer Anreicherung von Allopurinol während seiner Resorption im Dünndarmepithel beruhen. Ob diese Verminderung der exogenen Uratquote bei Zufuhr dieses Mittels durch die Ausscheidung

entsprechender Mengen von Oxypurinen kompensiert wird, dürfte dann in erster Linie davon abhängen, ob diese Verbindungen, nachdem sie sich vor dem Block anhäufen, vornehmlich ins Interstitium mit ausschließlicher Verteilung, auch in das Plasma- oder in das Darmlumen diffundieren, mit nachfolgendem bakteriellem Abbau. Der Oxypurinnachweis im Stuhl nach vollständiger Bakteriostase im Darm könnte zur Klärung dieser Hypothese beitragen.

2.3.2. Pyrimidinstoffwechsel

Ähnlich dem Purinstoffwechsel, so existieren auch Störungen des Pyrimidinstoffwechsels, darunter die sehr häufige, gesteigerte Ausscheidung von ß-Aminoisobutyrat (ß-AIBA), die allerdings keinerlei pathologische Bedeutung hat und die wichtigste genetische Erkrankung des Pyrimidinstoffwechsels, die hereditäre Orotacidurie. Es handelt sich um eine Rarität, zu deren Symptomatik eine megaloblastäre Anämie, Leukopenie, Verlangsamung von Wachstum und geistiger Entwicklung und massiver Ausscheidung von Orotsäure im Urin gehört (37, 54, 7, 59, 65, 73, 24).
Die Aktivitäten der Orotidin-5-Pyrophosphorylase sowie der Orotidyl-Decarboxylase fehlen oder sind nur in Spuren nachweisbar.

Tab. 3:
Störungen des Pyrimidinstoffwechsels: (nach G. Löffler, 1975)

Primäre Störungen	1. ß-Aminoisobutyraturie 2. Hereditäre Orotacidurie
Sekundäre Störungen	1. Gesteigerter Nukleinumsatz 2. Ornithin-Transcarbamylase-Mangel 3. Pharmaka: 6-Aza-uridin Allopurinol

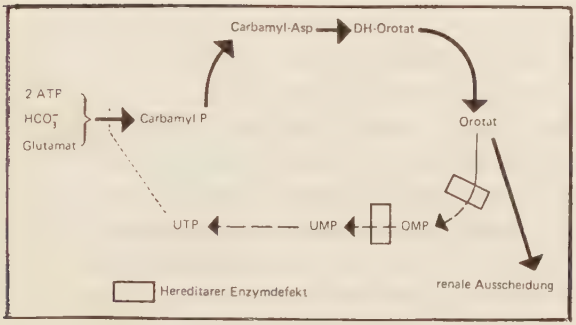


Abb. 11:
Entstehung der Hereditären Orotacidurie
(nach G. Löffler, 1975)

Die Folge dieses Enzymdefektes ist ein Anstau von Orotsäure, der auch noch unterstützt wird durch das Fehlen des Endproduktes UTP der Biosynthese, welches eine Hemmung auf die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Biosynthese ausüben würde. Auf diese Weise geht dem Organismus die Fähigkeit zur Pyrimidinsynthese verloren, was schwerwiegende Störungen des Zellstoffwechsels nach sich zieht.

Wichtig: im Hinblick auf den Einfluß von Allopurinol auf den Pyrimidinstoffwechsel muß darauf hingewiesen werden, daß gerade Allopurinol und ein anderes Pharmakon (6-Aza-uridin) ebenso wie ein erhöhter Nukleinsäureumsatz als Ursache einer sekundären Orotacidurie diese hereditäre Störung nachahmen können.

Im Jahre 1970 wurde erstmals über eine Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol berichtet. Mehrere Autoren beobachteten unter Allopurinolbehandlung einen Anstieg der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin (22, 41, 43). Dieser Anstieg ist auf eine Hemmung des Enzyms Orotidyl-Decarboxylase zurückzuführen, das für die Umwandlung von Orotidin-5-Monophosphat zu Uridin-5-Monophosphat verantwortlich ist. In vitro Untersuchungen ergaben, daß Xanthin- und Allopurinolribonukleotid ausgeprägte Inhibitoren der Orotidyl-Decarboxylase sind (41). Da beide

Ribonukleotide aus ihren Basen in Gegenwart von 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat und Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) synthetisiert werden, wurde zuerst angenommen, daß die Hemmung der Pyrimidinsynthese durch Allopurinol nur bei Personen mit normaler Aktivität der Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) möglich ist. Die Beobachtung, daß auch Patienten mit Lesch-Nyhan-Syndrom, die einen Verlust der HGPRT-Aktivität aufweisen, nach Verabreichung von Allopurinol eine vermehrte Ausscheidung von Orotidin und Orotsäure aufweisen (5, 23), war jedoch mit dieser Hypothese nicht in Einklang zu bringen.

Untersuchungen von Beardmore und Kelley (6) ergaben, daß Orotatphosphoribosyltransferase, das mit Orotidyl-Decarboxylase einen Enzymkomplex bildet, ebenfalls an der Bildung eines Inhibitors der Decarboxylase während der Allopurinoltherapie beteiligt ist. Aus ähnlichen Studien schlossen Fox und Mitarbeiter (23), daß diese Hemmung der Orotidyldecarboxylase auf der Bildung eines durch Orotatphosphoribosyltransferase synthetisierten Ribonukleotidderivates von Oxipurinol zurückzuführen ist. Wurden einem Inkubationsgemisch, das Oxipurinol und 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat enthielt, Hypoxanthin oder Orotsäure zugesetzt, so konnte die Bildung eines Inhibitors von

Orotidyl-Decarboxylase verhindert werden (6). Beardmore und Kelley (6) schlossen daraus, daß in vivo wahrscheinlich zwei Oxipurinolmetaboliten synthetisiert werden, nämlich die durch Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase katalysierte Synthese von 1-Oxipurinolribonukleotid sowie die durch Orotatphosphoribosyltransferase katalysierte Bildung von 7-Oxipurinolribonukleotid.

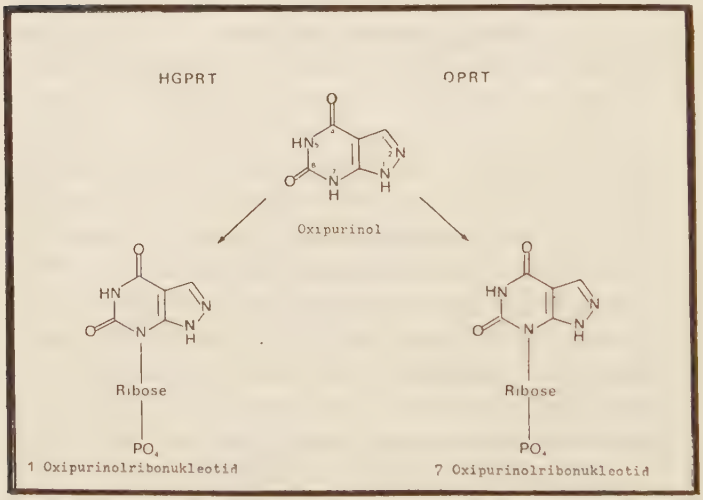


Abb. 12:
Die Umwandlung von Oxypurinol zu seinen Ribonukleotidderivaten
(modifiziert nach Beardmore und Kelley, 1971)

Diese beiden Ribonukleotidderivate dürften gemeinsam mit Allopurinolribonukleotid und Xanthosin-5-Monophosphat die Hemmung der Pyrimidinsynthese während einer Allopurinolbehandlung verursachen. Im Rahmen dieser Befunde dürfte 7-Oxipurinolribonukleotid der einzige Metabolit sein, der die Pyrimidinsynthese bei einem mit Allopurinol behandeltem Lesch-Nyhan-Patienten hemmt. Ob die Oxipurinolribonukleotide auch zu einer Hemmung der Purinsynthese de novo führen, ist noch ungeklärt.

Der Hemmung der Orotidyl-Decarboxylase folgt unter kontinuierlicher Verabreichung von Allopurinol innerhalb von ein bis zwei Wochen ein Anstieg der Aktivität von Orotatphosphoribosyltransferase und Orotidyl-Decarboxylase (23, 4). Die Ursache dieses Enzymanstieges ist noch nicht vollständig geklärt. Während Fox und Mitarbeiter (23) eine Enzymstabilisierung von Orotatphosphoribosyltransferase und Orotidyl-Decarboxylase annahmen, führen Beardmore und Kelley (4) den Anstieg beider Enzymaktivitäten auf eine "Enzym-Aktivierung im weitesten Sinne" zurück. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß der Anstieg beider Enzymaktivitäten auf einer Enzymstabilisierung auf der Basis einer Änderung der Molekülgröße beruht (31).

1971 wurde erstmals über eine Beeinflussung der durch Allopurinol induzierten Orotacidurie mittels Ribonukleinsäure berichtet (89). Die zusätzliche tägliche Verabreichung von 4 g Ribonukleinsäure bewirkte bei gesunden Versuchspersonen, die täglich 400mg Allopurinol einnahmen, innerhalb weniger Tage eine deutliche Abnahme der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin. Dementsprechend führte die Zulage von Allopurinol bei Personen, die täglich 4 g Ribonukleinsäure einnahmen, zu keinem ausgeprägten Anstieg der Orotsäureausscheidung. Diese Befunde sind mit einer Hemmung der Pyrimidinsynthese durch exogene Pyrimidinderivate vereinbar. Damit im Einklang steht auch die klinische Beobachtung, daß bei der hereditären Orotacidurie, der einzigen bisher beim Menschen bekannten angeborenen Primidinstoffwechselstörung, die Verabreichung von Uridin zu einer Reduktion der renalen Ausscheidung von Orotsäure führt (37, 7).

3. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

3.1. Problemstellung

a) Purinstoffwechsel

Unter Verabreichung von Allopurinol kommt es zu einem stärkeren Abfall von Serumharnsäure und renaler Harnsäureausscheidung als die Hemmung der Xanthinoxidase durch Anstieg der renalen Oxypurinausscheidung erwarten ließe. Dieses sog. "Purindefizit" erklären einzelne Autoren (55, 36, 13, 15, 21) mit verschiedenen Theorien über eine Hemmung der Purinsynthese de novo durch Allopurinol. Eine alternative Hypothese zur Erklärung des Purindefizits wird von Zöllner und Gröbner (88) angegeben. Aufgrund ihrer Untersuchungen beeinflußt Allopurinol unterschiedlich die endogene und exogene Harnsäurebildung.

b) Pyrimidinstoffwechsel

Fox und Mitarbeiter (22) sowie Kelley und Beardmore (41) berichten 1970 über einen Anstieg der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin unter kontinuierlicher Verabreichung von Allopurinol. Dieser Anstieg beruht auf einer Hemmung der Orotidyl-Decarboxylase (ODC), die für die Umwandlung von Orotidin-5-Phosphat zu Uridin-5-Phosphat verantwortlich

ist. Die durch Allopurinol induzierte Orotacidurie benutzten 1971 Zöllner und Gröbner (89) sowie 1977 Gröbner und Zöllner (32) als Modell, um den Einfluß verschiedener Purin- und Pyrimidinderivate auf die Pyrimidinsynthese zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit ging es darum, unter standartisierten Ernährungsbedingungen für den Purinstoffwechsel: Die Hypothese von Zöllner und Gröbner (88) über den Einfluß von Allopurinol auf endogene und exogene Harnsäurebildung zu bestätigen. --
Und für den Pyrimidinstoffwechsel: Die von Zöllner und Gröbner (89) beschriebene Beeinflussung der durch Allopurinol induzierten Orotacidurie nach Verabreichung von Ribonukleinsäure (RNS) deutlich zu machen und eventuelle Unterschiede der gewonnenen Ergebnisse nach Zulage von Inosin, GMP oder Cytosin herauszuarbeiten.

3.2. Methodik

3.2.1. Versuchspersonen

Für den Ernährungsversuch stellten sich vier gesunde Versuchspersonen im Alter zwischen 18 und 52 Jahren, zwei Männer und zwei Frauen, zur Verfügung. Drei Versuchspersonen erhielten als Zusatz zu einer isoenergetischen Formeldiät, unter Verabreichung von 400 mg/die Allopurinol jeweils 4 g/die Inosin (Purinnukleosid), 4 g/die Guanosin-5-Monophosphat (G-M-P, Purinnukleotid) bzw. 4 g/die Cytosin (Pyrimidinbase). Eine Versuchsperson erhielt außer Allopurinol keinen Zusatz und diente somit als Kontrolle.

Tabelle 4:

VP	Alter	Geschlecht	Größe	Gewicht	Körperoberfl.	Zulage
Einheit		m/w	cm	kg	m^2	4g/die
F1	24	m	181	76	1,96	Inosin
F2	52	w	176	79	1,95	------
F3	22	w	172	58	1,68	GMP
F4	23	m	190	81	2,08	Cytosin

Tabelle 5: Laborwerte der Versuchspersonen

VP	Kreatinin	Harnsäure	K	GOT	GPT	alk.PH.
F1	1,1	4,2	4,6	9	6	100
F2	0,9	4,9	3,9	9	8	z.w.
F3	0,9	4,0	3,7	10	6	95
F4	1,0	5,4	3,7	7	7	113

3.2.2. Die Diät

Der Sinn der verwendeten Diät lag darin, den Versuchspersonen alle zum Leben notwendigen Nahrungsbestandteile zukommen zu lassen, ohne den Stoffwechsel mit den in der Normalnahrung anfallenden Purinstoffen zu belasten. Das heißt, die Diät sollte isoenergetisch sein.

Tabelle 6: Die Zusammensetzung der Diät

Proteinanteil	Fettzusatz	Kohlenhydratanteil	Vitamine
Magermilch-sprüpulver (MMSP)	Livio^{R} Speiseöl	Maltodextrin^{R}	Loh-previt^{R} Multi-vitamin-präparat
33 % Prot., 47 % KH, 5 % H_2O, 0,73 % Fett 14,27 % Mineralien		94 % KH, bis 5 % H_2O	

Die errechnete Menge an MMSP und Maltodextrin für die einzelne Versuchsperson wurde auf einer Analysenwaage genau abgewogen und mit dem Liviol, das in ml gemessen wurde, in einer Rührmaschine mit 1000 ml H_2O zu einem homogenen Brei vermengt. Dieser Brei wurde sorgfältig aus der Schüssel ausgekratzt und in paraffinierte Milchtüten gefüllt. Die Versuchspersonen wurden darauf hingewiesen, die Tüten gänzlich auszuleeren, damit kein Kalorienanteil verlorengehen konnte. Die Versuchspersonen nahmen den Brei regelmäßig 4 mal am Tag zu sich.

Tabelle 7: Tagesumsatz bzw. Kalorienbedarf

VP	Oberfläche nach: Du Bois m^2	Grundumsatz nach: Boothby $kcal/m^2/h$	Tagesumsatz kcal / 24 h	Faktor	Tages-arbeits-umsatz: kcal/24h
F1	1,96	38,7	1820	1,7	3094
F2	1,95	33,4	1563	1,7	2657
F3	1,68	35,2	1419	1,7	2412
F4	2,08	39,0	1947	1,7	3309

Der Umrechnungsfaktor 1,7 (Tannhausers Lehrbuch, 83) entspricht einer leichten Bürotätigkeit und damit der Tätigkeit unserer Versuchspersonen, die Studenten mit Vorlesungen und Laborarbeit waren.

Tabelle 8a: Berechnung der Diätzusammensetzung, bezogen auf 1000 kcal

Bestandteile	Protein (P) 1 g ≙ 4 kcal	Kohlenhydrat (K) 1g ≙ 4 kcal	Fett (F) 1 g ≙ 1,1 ml ≙ 9 kcal
Anteile % ≙ kcal	15 % ≙ 150 kcal	55% ≙ 550 kcal	30% ≙ 300 kcal
Magermilchspritzpulver (MMSP) 33% P 47% K 0,7% F	150 kcal = 37,5 g ≙ 33% bei 100% = 113,6 g trocken = 119,3 g feucht	47% = 53,3 g	0,73 % = 0,83 g
Maltodextrin 94% K		550 kcal = 137,5 g 137,5 g - 53,3 g = 84,2 g 84,2 g ≙ 94 % bei 89,7 g ≙ 100% feucht	
Livioöl 100% F			300 kcal = 32,2 g 32,2 g - 0,83 g = 31,4 g 31,4 g ≙ 34,5 ml
Faktor $f = \frac{g}{1000\ kcal}$	f(P) = 119,3	f(K) = 89,7	f(F) = 34,7

Berechnung der Diätzusammensetzung nach der Formel:

$$\text{Substanz (g/24h)} = \text{Faktor X} \quad \frac{\text{Gesamtkalorien /VP und Tag}}{1000}$$

Tabelle 8b: Übersicht über die einzelnen Teilmengen:

	MMSP	Maltodextrin	Livioöl	H_2O
F1	369,1 g	277,5 g	106,74 ml	1000 ml
F2	316,9 g	238 g	91,66 ml	1000 ml
F3	287,7 g	216,3 g	83,21 ml	1000 ml
F4	394,7 g	296,8 g	114,16 ml	1000 ml

3.2.3. Versuchsablauf

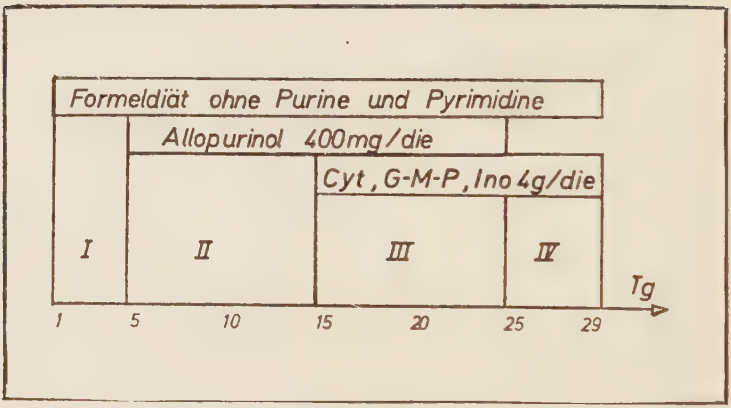


Abb. 13:
Versuchsablauf

Während der gesamten Versuchsdauer von 29 Tagen wurde die Formeldiät verabreicht, während der ersten vier Tage ausschließlich, in der 2. Periode (Tag 5 - 14) zusätzlich 400 mg Allopurinol. In der 3. Periode (Tag 15 - 24)

und 4. Periode (Tag 25 - 29) wurden je 4 g der zu untersuchenden Stoffe (GMP, Inosin bzw. Cytosin) verabreicht, d. h. während der 3. Versuchsperiode gemeinsam mit Allopurinol, während der 4. Periode als einziger Zusatz zur Formeldiät.

Zur späteren Auswertung des Versuches wurden täglich die unter 5 ml Toluol gesammelten 24 h-Urinmengen der Versuchspersonen gemessen und zu 50 ml Proben mit Aufschrift von Tag, speziellem Zusatz und Namen der Versuchsperson bei - 20°C eingefroren. Beginnend mit dem ersten Versuchstag wurde den Versuchspersonen jeden zweiten Tag morgens aus der Kubitalvene ca. 10 ml Nüchternblut entnommen, welches heparinisiert für die spätere Bestimmung von Werten aus Serum und Erythrocyten im Labor zentrifugiert, ettikettiert und wiederum eingefroren werden mußte. Zudem mischte man täglich die Diätmilch der jeweiligen Versuchsperson für den folgenden Tag und fuhr diese mit etwaigen Geschmackszusätzen (Kakao, Vanille, Zitrone), den Tabletten (Vitaminpräparat und Allopurinol) und den vormals präzise ausgewogenen Mengen an GMP, Inosin oder Cytosin aus.

Die Versuchspersonen waren angehalten, jeden Morgen das Gewicht (unter gleichen Bedingungen) zu kontrollieren und im Versuchsprotokoll zu vermerken. Bei der Tendenz zu Gewichtsverlust oder Gewichtsvermehrung wurde die Kalorienzufuhr entsprechend korrigiert.

Folgende Parameter wurden zur Beurteilung der Wirkung von Allopurinol auf den Purin- und Pyrimidinstoffwechsel bestimmt:
Harnsäure (aus Serum und Urin), die Oxypurine (Hypoxanthin und Xanthin aus Urin) für den Purinstoffwechsel und Orotsäure (aus Urin) und die Orotidyl-Decarboxylase-Aktivität (aus gew. Erythrocyten) für den Pyrimidinstoffwechsel.

3.2.4. Methoden

3.2.4.1. Enzymatische Harnsäurebestimmung nach Praetorius und Poulsen (1953), modifiziert nach Zöllner (1963)

Prinzip:

Durch die Einwirkung des Enzyms Uricase wird Harnsäure in Allantoin umgewandelt. Gleichzeitig verschwindet die für Harnsäure typische Absorbtionsbande bei 293 nm. Dieser Extinctionsabfall beträgt bei Verwendung des unten angegebenen Glycinpuffers 0,0745 für eine Harnsäurekonzentration von 1µg/ml und einer Schichtdicke von 1 cm.

Reagenzien:

a) Glycinpuffer-Stammlösung 2/3 molar, pH 9,3
(aus der Klinikapotheke)
Aufbewahrung im Kühlschrank über Chloroform

b) Glycinpuffer-Gebrauchslösung
Herstellung aus Glycinpuffer-Stammlösung
Verdünnung 1:10 mit aqua bidestillata

c) Enzympräparat Uricase Loewens
(Løvens Kemiske Fabrik, Kopenhagen)
75 Units/Ampulle

d) Uricase-Stammlösung
Auflösen des Ampulleninhaltes der Uricase Leowens in 0,25 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung

e) Unicase-Gebrauchslösung
Vor der Durchführung der Bestimmung wird eine entsprechende Menge der Uricase-Stammlösung mit Glycinpuffer-Gebrauchslösung 1:100 verdünnt.
Unter den vorliegenden Bedingungen liegt die Eigenextinktion der Uricase-Gebrauchslösung zwischen 0,008 und 0,017 (Mittel: 0,015).

Durchführung:

1 ml Serum wird mit Glycinpuffer-Gebrauchslösung im Meßkölbchen auf 25 ml verdünnt (Urin: 0,2 ml ad 25 ml). Beim Verdünnen ist zu beachten, daß Serum in alkalischem Milieu leicht schäumt. Daher ist es ratsam, zunächst nur unter leichtem Schwenken zu mischen, bis zur Eichmarke aufzufüllen und dann erst endgültig zu mischen. Da Harnsäure im alkalischen Milieu an der Luft oxidiert, muß von da an zügig weitergearbeitet werden.

Ansätze für die Photometrie:

A) Zur Bestimmung der Eigenextinktion des Enzymes (E_F)

I 2 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung,
1 ml Uricase-Gebrauchslösung

II 3 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung

B) Zur Bestimmung des Extinktionsabfalles in Serum bzw. Urin (E_{HS})

III 2 ml Serumverdünnung (Urinverdünnung),
1 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung

IV 2 ml Serumverdünnung (Urinverdünnung),
1 ml Uricase-Gebrauchslösung

Alle Ansätze werden gut geschüttelt und bei Zimmertemperatur 30 - 60 Minuten inkubiert. Die Photometrie erfolgt am Spektralphotometer im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 293 nm unter Verwendung von Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm.

Die am Photometer abgelesenen Extinktionen sind Extinktionsdifferenzen zwischen den beiden zur gleichen Zeit im Strahlengang befindlichen Küvetten. Im vorliegenden Fall werden II gegen I und IV gegen III als Null- bzw. Referenzwert

abgelesen. Um Verunreinigungen zu vermeiden, werden für die jeweiligen Ansätze (mit und ohne Uricase-Gebrauchslösung) immer dieselben Küvetten verwendet.

Berechnung:

Da nur jeweils einem der Ansätze Uricase zugesetzt wird, fallen die am Photometer abgelesenen Extinktionsdifferenzen um den Betrag der Eigenextinktion (E_F) zu niedrig aus und bei der Berechnung ist somit dem enzymatisch herbeigeführten Extinktionsabfall für Harnsäure (E_{HS}) der getrennt ermittelte Betrag der Enzymeigenextinktion hinzuzufügen. Die Harnsäurekonzentration im Ansatz ist proportional $E_F + E_{HS}$.

Die Konzentration an Harnsäure im Versuchsansatz ist:

$$\frac{E_F + E_{HS}}{0{,}0745} \quad \mu g/ml$$

0,0745: entspricht dem Extinktionskoeffizienten für eine Harnsäurelösung von 1 µg/ml in einer Küvette von 10 mm Schichtdicke.

Unter Berücksichtigung der einzelnen Verdünnungen erfolgt die Berechnung der Harnsäurewerte nach folgender Formel:

<u>Serum:</u> $\frac{(E_F + E_{HS}) \times 3 \times 25 \times 100}{0{,}0745 \times 2 \times 1000}$ mg% Harnsäure

$= \frac{(E_F + E_{HS}) \times 100}{2}$ mg% Harnsäure

$= (E_F + E_{HS}) \times 50$ mg% Harnsäure

<u>Urin:</u> $HS = \frac{(E_F + E_{HS}) \times 3 \times 125 \times 100}{0{,}0745 \times 2 \times 1000}$ mg% Harnsäure

$= (E_F + E_{HS}) \times 250$ mg% Harnsäure

Die in 24 Stunden ausgeschiedene Menge Harnsäure berechnet sich somit:

$HS/24h = (E_F + E_{HS}) \times 250 \times HV/100$ mg/24 h

HV = 24h-Harnvolumen in ml

3.2.4.2. Methode zur enzymatisch-spektrophotometrischen Bestimmung der Oxypurine (Xanthin und Hypoxanthin) nach Klingenberg et al. (1967)

Prinzip:

Unter Einwirkung des Enzyms Xanthinoxidase (XO) werden Xanthin (X) und Hypoxanthin (HX) in alkalischer Lösung zu Harnsäure (HS) oxidiert, was zu einem Absorbtionsanstieg bei 293 nm führt. Nach Zugabe von Uricase (U) wird Harnsäure zu Allantoin abgebaut, das die typische Absorbtionsbande von Harnsäure bei 293 nm nicht aufweist. Wird nun die im Urin ausgeschiedene Harnsäure in einem Ansatz mit Uricase zu Allantoin abgebaut und in einem zweiten Ansatz die vorgebildete (präformierte) Harnsäure und die nach XO-Zugabe aus den Oxypurinen neugebildete Harnsäure insgesamt abgebaut, so kann man die aus den Oxypurinen gebildete Harnsäure rechnerisch ermitteln.

Ansatz I: d. präformierte HS
Ansatz II: d. präformierte und neugebildete HS

Die aus den Oxypurinen neugebildete Harnsäure erhält man aus der Differenz zwischen den HS-Mengen aus Ansatz II und Ansatz I.

Oxypurin-HS = Gesamt-HS —— präformierte HS

Oxypurin-HS = A II —— A I

Reagenzien:

a) Xanthinoxidase^{R} (Boehringer Mannheim GmbH)
- Suspension aus Kuhmilch:
10 ml = 100 mg Enzymprotein, 4U/ml

b) Xanthinoxidase-Gebrauchslösung
2 ml XO verdünnt mit 0,66 ml Na-Pyrophosphatpuffer 0,1m, pH 8,6 und 0,1 ml Katalase (zur Verhinderung des oxidativen Abbaus der Harnsäure im Reaktionsgemisch)

c) Katalase^{R} (Boehringer Mannheim GmbH)
- aus Rinderleber, Lösung in Glycerin

d) Uricase^{R} (Løvens Kemiske Fabrik, Ballerup, DK)
75 U/Ampulle

e) Uricase-Gebrauchslösung
siehe 3.2.4.1. - Harnsäurebestimmung

f) Natrium-Pyrophosphatpuffer 0,1 m, pH 8,6
(Klinikapotheke)

f) Glycinpuffer 0,1 m, pH 9,3
(Klinikapotheke

Durchführung:

Die Urinproben werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, geschüttelt und noch warm filtriert. Anschließend werden sie mit aqua bidestillata 1 : 50 verdünnt. In vier Reagenzgläser werden jeweils 1 ml der Urinverdünnung und 2 ml NaPP-Puffer einpipettiert.

Glas 1 und 2 entspricht den Doppelwerten von Ansatz II

Glas 3 und 4 entspricht den Doppelwerten von Ansatz I

Nun wird die Extinktion des Urin-Puffergemisches bestimmt (Glas 1 - 4). Dabei muß der Küvetteninhalt in die Reagenzgläser quantitativ zurückgegeben werden. Darauf wird in Ansatz II je 0,01 ml XO gegeben, geschüttelt und nach ca. 30' abgelesen (Küvetteninhalt zurückgeben). Nun pipettiert man in Ansatz II und I jeweils 0,5 ml Uricase ein und liest nach minimal 3 - 4 Stunden ab. Bei größeren Ansätzen kann die Uricase-Extinktion auch am nächsten Morgen noch abgelesen werden (bei 293 nm UV-Bereich gegen Wasser als Referenz).

Nach Zugabe von XO steigt die Extinktion vom Ausgangswert kontinuierlich bis zu einem Maximalwert an, der über mindestens 10' stabil bleiben muß. Nach der Zugabe von Uricase sinkt die Extinktion in beiden Ansätzen nach Beendigung der Reaktion unter den Ausgangswert ab, sofern der Urin nicht hoch konzentriert ist. Die Endextinktion von Ansatz II ist höher als die von Ansatz I, da XO eine Eigenextinktion hat, die durch Differenzbildung in der Berechnung nicht berücksichtigt zu werden braucht. Dasselbe gilt für die Eigenextinktion der Uricase.

Tabelle 9: Übersichtschema

Ansatz II		Ansatz I	
Gesamt-HS		präformierte HS	
Verdünnung 1 : 3,51		1 : 3,50	
Glas 1	Glas 2	Glas 3	Glas 4
X_1 1 ml Urinverd.	X_1' 1 ml Urinverd.	X_3 1 ml Urinverd.	X_3' 1 ml Urinverd.
2 ml NaPP-Puffer	2 ml NaPP-Puffer	2 ml NaPP-Puffer	2 ml NaPP-Puffer
0,01 ml XO	0,01 ml XO	---	---
X_2 0,5 ml U	X_2' 0,5 ml U	X_4 0,5 ml U	X_4' 0,5 ml U

Berechnung:

Aus den Doppelwerten von Ansatz II und Ansatz I werden die Mittelwerte gebildet und die Verdünnung durch den Faktor 1,17 den übrigen Werten angepaßt.

$$\text{Verdünnung} \quad \frac{\text{Ansatz I}}{\text{Ansatz II}} = \frac{3{,}50}{3{,}51} = 1{,}17$$

ΔE MW x_1/x_1', nach XO und vor U
ΔE MW x_2/x_2', nach XO und nach U
$>$ A II, präformierte + neugebildete HS

ΔE MW x_3/x_3', vor U
ΔE MW x_4/x_4', nach U
$>$ A I, präformierte HS

Formel:

$$\frac{\Delta E \quad (II-I) \times 50 \times 3 \times \frac{\text{Urinmenge}}{100}}{0{,}075 \times 1000} = \text{neugebildete HS (mg/die)}$$

oder:

$$\frac{(E_1 - 1{,}17 \times E_2) - (E_3 - 1{,}17 \times E_4) \times 50 \times 3 \times \text{Urinmenge}/100}{0{,}075 \times 1000}$$

bzw.:

$\Delta E \times 2 \times$ Urinmenge/100 = neugebildete HS (mg HS/die)

3.2.4.3. Methode der Orotsäurebestimmung im Urin nach Rogers und Porter (1968)

Prinzip:

Diese Bestimmung gründet sich, wie bereits Adachi et al. (1963) beschrieb, auf folgende Reaktionen:

1. Orotsäure reagiert mit gesättigtem Bromwasser zu 5,5'-Dibrombarbitursäure

2. 5,5'-Dibrombarbitursäure wird durch Ascorbinsäure zur Barbitursäure reduziert

3. Barbitursäure und p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich Reagenz) ergeben einen gelben Farbkomplex, dessen Absorbtionsmaximum bei 480 nm liegt.

Reagenzien:

a) Kalium-Citratpuffer, 0,2 m, pH 2,5

b) gesättigtes Bromwasser

c) Ascorbinsäure 5 %, gelöst in Kalium-Citrat (a)

d) p-Dimethylaminobenzaldehyd 2,5 % (Ehrlich Reagenz), gelöst in n-Propanol

Alle Reagenzien wurden in der klinikeigenen Apotheke bezogen.

Durchführung:

Die Urinproben werden zuerst erwärmt, nicht in Lösung gehendes Sediment abfiltriert, anschließend wird die Orotsäurebestimmung bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Ansatz:

Reagenzglas mit	0,5 ml	Urin (bei Eichkurve statt Urin Orotsäure)
+	2,5 ml	Kalium-Citratpuffer
+	0,5 ml	Bromwasser (unterm Abzug)
nach 1 Minute +	1 ml	Ascorbinsäure - schütteln!
nach weiteren 2 Minuten +	2 ml	Ehrlich Reagenz - schütteln!

Nach 90 Minuten Reaktionsablauf wird die Extinktion am Photometer zuerst bei 480 nm, dann bei 412 nm gegen einen entsprechenden Leerwert abgelesen.

Leerwert:	3 ml	Kalium-Citratpuffer
+	0,5 ml	Bromwasser
+	etc.	

Zeitplan für die Bestimmungsmethode:

Es werden immer einzelne Fraktionen mit je 8 Reagenzgläsern verwendet!

1. Bromwasser (mit Eppendorfpipette)
   ---------- nach 1 Minute

2. Ascorbinsäure (mit 10 ml Pipette)
   8 Gläser in 2 Minuten pipettieren

3. Ehrlichreagenz (mit 20 ml Pipette)
   zugeben ----------

4. nach 90 Minuten wird am Photometer abgelesen.

Berechnung:

Die nach Reaktionsablauf bei 480 nm abgelesenen Extinktionen sind proportinal der im Urinansatz enthaltenen Menge an Orotsäure. Neben Orotsäure zusätzlich im Urin enthaltene Substanzen bewirken bei 480 nm ebenfalls eine gewisse Extinktion, wobei deren Absorbtionsmaximum eigentlich bei 412 nm liegt.

Erfahrungsgemäß verhalten sich die Extinktionswerte dieser Substanzen bei 412 nm und bei 480 nm wie 3:1 (65). Daraus ergibt sich, daß der bei 480 nm abgelesene Wert für die Orotsäureextinktion um ein Drittel des bei 412 nm abgelesenen Extinktionswertes berichtigt werden muß.

$$E_{\text{Orotsäure}} = (E_{480} - E_{412}) : 3$$

Vor der Orotsäurebestimmung aus den Urinproben wird anhand einer Verdünnungsreihe aus Orotsäurestammlösung (8 mg/100 ml) eine Eichkurve erstellt.

Bei einem Probevolumen von 0,5 ml Urin und einem Harnvolumen (HV) in ml bezogen auf 24h ergibt sich für die tägliche, mit dem Urin ausgeschiedene Orotsäuremenge (OS):

$$OS/24h = (E_{480} - E_{412}:3) \times 2 \text{ (Verdünnung)} \times HV \text{ mg/die}$$

3.2.4.4. Messung der Enzymaktivität der Orotidyl-Decarboxylase (ODC) nach Appel S. H. (1968) sowie Kelley und Beardmore (1970)

Prinzip:

Das im Hämolysat vorhandene Enzym Orotidyl-Decarboxylase (ODC) spaltet aus dem 7-^{14}C-markierten Substrat OMP die Carboxylgruppe in Position-C_7 ab.

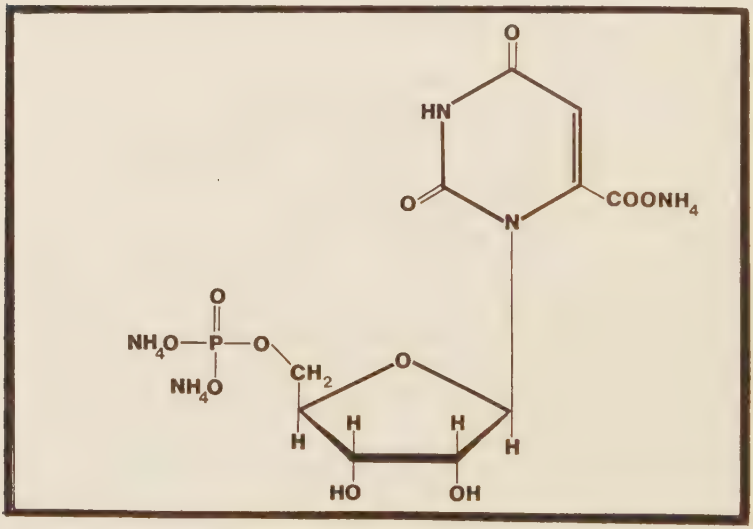


Abb. 14:
Orotidin-Carboxyl-^{14}C-5-Monophosphat als Triammoniumsalz

Das $^{14}CO_2$ reagiert mit Hyaminhydroxid unter Bildung von Karbonat und H_2O. Nach Erfassung der Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers kann unter Berücksichtigung der Eiweißmenge im Hämolysat auf die Orotidyl-Decarboxylaseaktivität rückgeschlossen werden, da die $^{14}CO_2$-Freisetzung sich proportinal zu Reaktionsdauer und Eiweißmenge verhält.

Reagenzien:

a) OMP-7 ^{14}C 10µM (Orotidin-Carboxyl-^{14}C-5'-Monophosphat als Triammoniumsalz, spezifische Aktivität 34,9 µCi/µMol, NEN New England Nuclear 575 Albanystreet, Boston, Mass. 02118, USA)

b) 0,01m Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,4

c) Hyaminhydroxid

d) 4m Perchlorsäure

Die unter b) - d) genannten Reagenzien werden aus der klinikeigenen Apotheke bezogen.

Durchführung:

Das dialysierte Hämolysat wird mit Kalium-Phosphatpuffer 0,01m, pH 7,4 1:10 verdünnt, die Substratlösung OMP-7^{14}C mit dem gleichen Puffer 1:20 verdünnt.
Das Hämolysat der einzelnen Proben (50 µl) wird im Eiswasserbad vorbereitet, um eventuelle Stoffwechselvorgänge auf ein Minimum zu reduzierer. Nach Zugabe von 50 µl OMP-7^{14}C wird das Reagenzglas umgehend mit einem speziellen Gummistopfen verschlossen, der das mit Hyamin_hydroxid gefüllte Auffangkölbchen trägt.

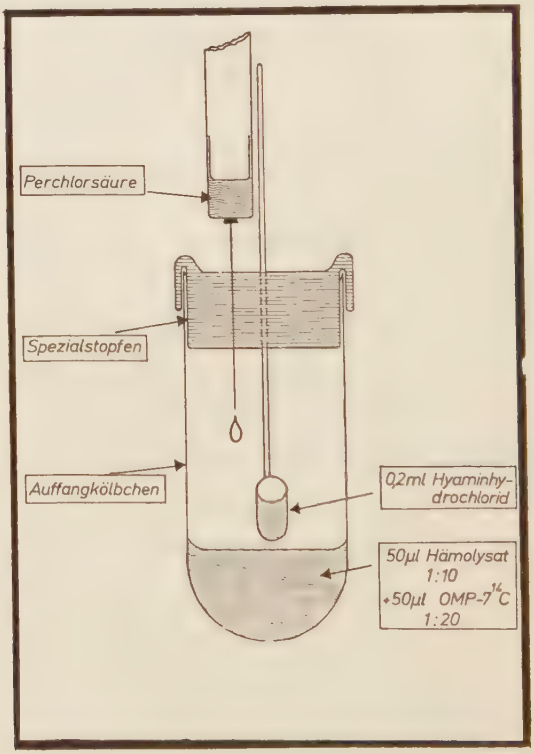


Abb. 15:
Versuchsdurchführung, Bestimmung der Orotidyl-Decarboxylaseaktivität

Durch Überführen des Reagenzglases vom Eiswasserbad in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad (Schüttelinkubator) wird die Reaktion gestartet. Nach genau 15 Minuten wird die Reaktion mit 0,2 ml Perchlorsäure gestoppt. Hierbei ist zu beachten, daß die Injektion der Perchlorsäure in den Reaktionsraum zügig erfolgt und ein Kontakt mit dem Auffangkölbchen vermieden wird. Zur Äquilibrierung werden die Proben nach Reaktionsende für rund 60 Minuten im Inkubator belassen. Daraufhin wird der Gummistopfen vom Auffanggefäß abgeschnitten und dieses in ein mit Szintillationsflüssigkeit gefülltes Zählgefäß eingegeben. Die Proben werden für 24 - 36 Stunden in einem kühlen Raum belassen und anschließend im Szintillationszähler ausgezählt, dessen Effizienz 90 % beträgt.
Der ODC-Versuch erfolgte als Dreifachbestimmung.

Berechnung:

I. Spezifische Aktivität des OMP-7^{14}C:

1 µMol ≙ 34,9 µCi (bei jeder Lieferung unterschiedlich)

1 µCi ≙ 2,22 x 10^6 counts/min (Zerfälle/min)

d.h. bei einer Effizienz des Zählers von 90 %:

II. 1 µMol ≙ 34,9 x 2,22 x 10^6 x 0,9 counts/min

1 µMol ≙ 69,7 x 10^6 counts/min (cpm)

(A = Anzahl der counts/min im Ansatz)

$$X\ \mu Mol = A\ counts/min$$

$$\frac{1\ \mu Mol}{X\ \mu Mol} = \frac{69{,}7 \times 10^6\ cpm}{A\ cpm}$$

$$X\ \mu Mol = \frac{A\ cpm \times Mol}{69{,}7 \times 10^6\ cpm}$$

Da die Reaktion nach 15 Minuten gestoppt wird, muß man mit dem Faktor 4 multiplizieren, um den Substratumsatz pro Stunde zu erhalten.

$$X\ \mu Mol/h = \frac{A \times 4}{69{,}7 \times 10^6} \times \mu Mol/h$$

III. $$X\ nMol/h = \frac{A \times 4}{69{,}7 \times 10^3} \times nMol/h$$

Der obige Ausdruck bezeichnet die pro Zeiteinheit umgesetzte Substratmenge, die von der im Hämolysat enthaltenen Eiweiß- bzw. Enzymmenge abhängig ist. Unter 3.2.4.5. beschreiben wir die Eiweißbestimmung im Hämolysat und werden anschließend die Berechnung der ODC-Aktivität, bezogen auf die im Hämolysat enthaltene Eiweißmenge korrigieren.

3.2.4.5. Eiweißbestimmung im Erythrocythenhämolysat mit Folin-Phenol-Reagenz, Methode nach Lowry

Prinzip:

Zwei verschiedene Reaktionsschritte führen letztlich zum spektophotometrisch meßbaren Farbkomplex mit Protein.

1. Die Reaktion von Eiweiß mit Kupfer in alkalischem Milieu
   (Anlagerung von CU^{++}-Ionen an die Peptidbindungsstellen, Biuretreaktionen)

2. Die Reduktion des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz durch das mit Kupfer vorbehandelte Protein (wahrscheinlich durch Dissoziation des Phosphats vom Molybdat).

Reagenzien:

a) 2 % Na_2CO_3-Lösung in 0,1n NaOH

b) 0,5 % Kupfer-Sulfat-Lösung ($CuSo_4 \cdot 5\ H_2O$) in 1 % Na-K-Tartrat

c) alkalische Kupferlösung aus 50 ml Reagenz a) und 1 ml Reagenz b) (direkt vor Gebrauch)

d) Folin-Ciocalteus-Phenol-Lösung, 1:2 mit H_2O verdünnt

e) 0,01 m Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,4

Die unter a), b), d) und e) genannten Reagenzien wurden aus der klinikeigenen Apotheke bezogen.

Durchführung:

Das dialysierte Hämolysat wird zunächst mit Kalium-Phosphatpuffer 1:10 verdünnt (siehe 3.2.4.4. ODC-Bestimmung). Die Weiterverdünnung auf 1:20 erfolgt mit demselben Puffer, die Endverdünnung von 1:400 wird mit 0,9 % NaCl hergestellt.

Zu 200 µl Hämolysat (1:400) werden 2 ml des frisch zubereiteten Reagenz c) gegeben, gut geschüttelt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt schnelle Zugabe von 0,2 ml Reagenz d) und sofortiges Schütteln. Nur wenige Sekunden Verzögerung beim Mischen verringert die maximale Farbentstehung. Nach 30 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur erfolgt daraufhin die spektrophotometrische Extinktionsmessung bei 498 nm.

Berechnung:

Die Ermittlung der im Ansatz enthaltenen Eiweißmenge (E) erfolgt mittels einer Eichkurve (Rinder-Albumin-Standart).
Eichkurve-Standart: 100 mg Rinderalbumin in 100 ml 0,9 % NaOH;
Leerwert: 2 mal alle Reagenzien (ohne Standart) + 200 µlNaCL

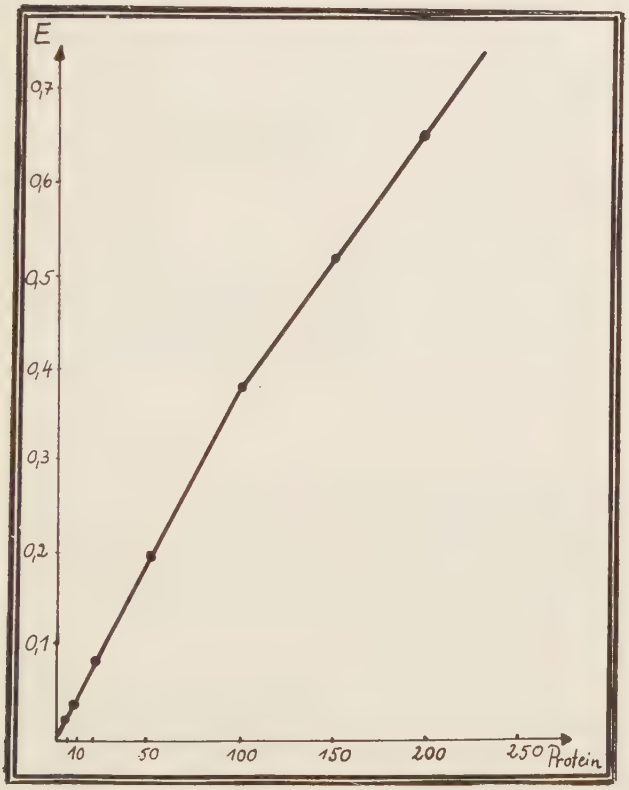
Tabelle 10:

Verdünnung für die Eichkurve:

Standart (µl)		NaCL (µl)
5	+	195
10	+	190
20	+	180
50	+	150
100	+	100
150	+	50
200	+	0

Abb. 16:

Beispiel der verwendeten Eichkurve vom
4. 3. 1977
Leerwert: 0,029



Berechnung der ODC-Aktivität bezogen auf Eiweiß:

letzte Berechnungsformel:

$$\text{III.}\quad X_{nMol/h} = \frac{A \times 4}{69{,}7 \times 10^3} \; x_{nMol/h}$$

Bei Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungen und unterschiedlichen Probenvolumina ergibt sich: Die Eiweißmenge (E) bestimmen wir in 0,2 ml Probe bei einer Endverdünnung von 1:400 (Abb. 16). Bei der ODC-Bestimmung beträgt das Probenvolumen 0,05 ml bei einer Endverdünnung von 1:10.

E	µg	bei 0,2 ml Probenvolumen
E x 5	µg	bei 1,0 ml
E x 5 x 40	µg	bei Verdünnung 1:10
$\frac{E \times 5 \times 40}{20}$	µg	bei Verdünnung 1:10 und Probenvolumen von 0,05 ml

E x 10	µg
$\frac{E \times 10}{1000}$	mg

Die pro mg Eiweiß und Stunde umgesetzte Substratmenge entspricht der Enzymaktivität der Orotidyl-Decarboxylase:

$$X_{nMol/mg/h} = \frac{A \times 4 \times 10^3}{69{,}7 \times 10 \times E \times 10^3} \; nMol/mg/h$$

$$\text{IV.}\quad X = \frac{A \times 4}{69{,}7 \times 10 \times E} \; nMol/mg/h$$

3.3. Ergebnisse:

Serumharnsäure (SHS) sowie renale Harnsäureausscheidung (RHS), renale Oxypurinausscheidung (ROXY) und renale Gesamtpurinausscheidung: (s. Abb. 17, 18, 19, 20 und Tabellen 11, 12, 13).

Periode I

Unter alleiniger Zufuhr der Formeldiät ergaben sich als mittlerer Ausgangswert für die SHS 3,7 mg% und für die RHS 300 mg/die.

Periode II

Nach Zulage von 400 mg/die Allopurinol fielen die Werte ab auf 2,3 mg% für die SHS und auf 174 mg/die (RHS), was einem prozentualen Anteil von 38 % (SHS) und 42 % (RHS) entspricht.

Periode III

Werden Purin- und Pyrimidinderivate in einer Dosierung von 4 g/die zur Formeldiät und Allopurinol 400 mg/die verabreicht, so kommt es bei den Purinzusätzen (Inosin und GMP) im Mittel zu einem Anstieg der SHS auf 3,8 mg% (= 65 %) und der RHS auf 348 mg/die (= 100 %).
Bei Verabreichung von Cytosin 4 g/die (Pyrimidinbase) kommt es dagegen zu einem weiteren geringfügigen Abfall von SHS 4,1 mg% auf 3,2 mg% (= 22 %)und

RHS von 203 mg/die auf 168 mg/die (= 17 %). Die Kontrollperson erhielt keine weiteren Zusätze. Demnach sind die SHS und RHS gegenüber der 2. Periode unauffällig.

Periode IV

Nach Absetzen von Allopurinol 400 mg/die steigen die betreffenden Werte bei den Purinzusätzen um 68 % auf 6,4 mg% (SHS) und 144 % auf 849 mg/die (RHS). Bei Zulage der Pyrimidinbase (Cytosin) 4 g/die kommt es zu einem geringeren Anstieg von SHS 3,2 mg% auf 3,5 mg% (= 9,3 %) und RHS von 168 mg/die auf 194 mg/die (15,4 %). Bei der Kontrollperson steigen die SHS und RHS ebenfalls gering, bedingt durch das Absetzen von Allopurinol 400 mg/die.
Die renale Oxypurinausscheidung (ROXY) zeigt folgende Veränderungen:

Periode II

Unter Allopurinol 400 mg/die beträgt die durchschnittliche ROXY 104 mg/die.

Periode III

Nach Gabe von 4 g/die Purinderivaten (Inosin und GMP) steigt die ROXY auf 543 mg/die (= 422 %). Bei Zulage von 4 g/die Pyrimidinbase (Cytosin) ergibt sich eine ROXY von 104 mg/die, womit kein weiterer

Anstieg gegenüber Periode II (Allopurinol 400 mg/die ausschließlich) verzeichnet werden kann.

Periode IV

Nach Absetzen von Allopurinol 400 mg/die fällt bei allen Versuchspersonen die ROXY auf die Ausgangswerte der I. Versuchsperiode zurück.

Die Gesamtpurinausscheidung im Urin beschreibt die Summe von RHS und ROXY.

Periode II

Ausgehend von durchschnittlich 308 mg/die sinkt die renale Gesamtpurinausscheidung unter Allopurinol 400 mg/die um 9,7 % auf 278 mg/die.

Periode III

Nach Zulage von 4 g/die Purinderivaten (Inosin und GMP) steigt die renale Gesamtpurinausscheidung auf im Mittel 892 mg/die (= 221 %) an. Nach Zulage von Cytosin 4 g/die (Pyrimidinbase) zeigt sich kein Anstieg, denn die Gesamtpurinausscheidung beträgt 271 mg/die (gegenüber 278 mg/die als Durchschnittswert während der 2. Periode unter Allopurinol alleine).

Periode IV

Nach Absetzen von Allopurinol 400 mg/die und unter weiterer Einnahme der Purinzusätze (Inosin und GMP) steigt die Gesamtpurinausscheidung noch geringfügig an auf 899 mg/die. Ähnliches läßt sich bei Zugabe von Cytosin 4 g/die nicht beobachten.

Serumharnsäure (SHS) sowie renale Orotsäureausscheidung (ROS):

(s. Abb. 21, 22, 23, 24, 25 und Tabelle 14).

Ergänzend zur Serumharnsäure, renalen Harnsäureausscheidung und der renalen Oxypurinausscheidung bestimmten wir die renale Orotsäureausscheidung, um die durch Allopurinol induzierte Orotacidurie nachzuweisen und eventuelle Veränderungen nach Verabreichung von Inosin, GMP und Cytosin je 4 g/die festzuhalten.

Periode I und II

Ausgehend von ROS 2,3 mg/die unter reiner Formeldiät zeigt sich nach Gabe von Allopurinol 400 mg/die eine durchschnittliche ROS von 19,4 mg/die.

Periode III

Werden GMP 4 g/die verabreicht, so fällt die ROS von anfangs 22,1 mg/die auf 16,7 mg/die, was einer Hemmwirkung der durch Allopurinol induzierten Orotacidurie von 24,4 % entspricht.

Wird statt GMP Inosin 4 g/die zugegeben, so kommt es zu einem Rückgang der ROS von 21,5 mg/die auf 13,5 mg/die, was einer Hemmung von 37,2 % entspricht.

Unter Cytosin 4 g/die läßt sich keine Hemmwirkung nachweisen, denn die ROS steigt um 8,8 % von 18,0 mg/die auf 19,6 mg/die.

Orotidyldecarboxylase-Aktivität (ODC):

(s. Abb. 26 und Tabelle 15)

Die Kontrollperson zeigt ein kontinuierliches Ansteigen der ODC-Aktivität während aller vier Perioden von anfangs rund 0,39nMol/mg Prot./Std. auf 0,8 nMol/mg Prot./Std. in der 4. Periode.

Unter Gabe von GMP 4 g/die zeigt sich ein ähnliches Verhalten. Die ODC-Aktivität steigt von 0,3 nMol/mg Prot./Std. (Periode I) kontinuierlich an bis zur 4. Periode, wo schließlich rund 0,6 nMol/mg Prot./Std. erreicht wurden.

Die ODC-Aktivitäten von zwei weiteren Versuchspersonen wurden später bestimmt und zeigen, gegenüber den beiden ersten ganz unterschiedliche Verläufe. Zum einen liegen die gemessenen Aktivitäten insgesamt wesentlich niedriger als die ODC-Aktivitäten der Kontrollperson und der Versuchsperson mit GMP-Zulage 4 g/die. Zum anderen fallen die Aktivitäten nach anfänglichem Anstieg bei Zugabe von Inosin 4 g/die und Cytosin 4 g/die während der 3. Periode stark ab, um später langsam wieder auf die Ausgangswerte der I. Periode anzusteigen.
Die ODC-Aktivitäten dieser beiden Versuchspersonen sind vermutlich für eine gültige Aussage nur bedingt zu verwerten.

4. D I S K U S S I O N

Versuche über den Einfluß von Nahrungspurinen und -pyrimidinen auf die Pyrimidinbiosynthese sowie die renale Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurine (Hypoxanthin und Xanthin) sollten unter standartisierten Ernährungsbedingungen mittels einer purin- und pyrimidinfreien Formeldiät erfolgen. Der Nahrung können dann genau ausgewogene Mengen chemisch wohl definierter Purin- und Pyrimidinträger zugegeben werden.

Die Versuchsdiäten müssen dabei isoenergetisch sein, da Änderungen der Energiezufuhr auch Effekte auf den Harnsäurestoffwechsel haben können. Zudem ist es notwendig, die einzelnen Versuchsperioden so lange fortzusetzen, bis ein steady state der zu untersuchenden Parameter eintritt.

Purinbiosynthese: (Abb. 17, 18, 19, 20, Tabellen 11, 12, 13)

a) Allopurinol führt zu einer Hemmung der Xanthinoxidase. Die Folge ist, daß sowohl die Serumharnsäure als auch die renale Harnsäureausscheidung abfallen, während gleichzeitig die renale Oxypurinausscheidung (Hypoxanthin und Xanthin) ansteigt.

b) Allopurinol führt ebenso wohl zu einer Hemmung der Purinsynthese de novo, da die Verringerung der renalen Harnsäureausscheidung nicht durch die vermehrte renale Oxypurinausscheidung voll ersetzt wird (66, 16, 68, 35, 88).

Untersuchungen an Menschen und mit Taubenleber ließen mehrere Mechanismen für die Hemmung von Allopurinol auf die Purinsynthese de novo annehmen: (Abb. 4, Seite 8).

1. Das Allopurinolribonukleotid hemmt das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Purinsynthese de novo - die 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase - sowohl der Taubenleber als auch des Menschen (55, 36).

2. Allopurinol führt durch Hemmung der Xanthinoxidase zu einer vermehrten Bildung von I-M-P, A-M-P und G-M-P aus Hypoxanthin, welche wiederum allosterische Inhibitoren des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms sind (13, 36, 45).

3. Allopurinol führt über eine Abnahme der 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphatkonzentration (Substrat des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms) zu einer verminderten Purinsynthese de novo (21).

Vermutlich läßt sich die Hemmung der Purinsynthese de novo durch Allopurinol auf alle drei Mechanismen zurückführen, wobei die quantitative Relevanz noch offen ist.

Eine alternative Hypothese zur Erklärung des "Purindefizits" nach Gabe von Allopurinol wird von Zöllner und Gröbner, 1970 (88) beschrieben, wonach dieses Medikament auf unterschiedliche Weise die endogene und exogene Harnsäurebildung beeinflußt. Während die Hemmung der endogenen Harnsäurebildung etwa 50 % ausmacht, wird die Harnsäurebildung aus exogenen Purinen durch Allopurinol fast vollständig unterdrückt.

Die Zunahme der Oxypurine (Hypoxanthin und Xanthin) im Urin zeigt bei einzelnen Versuchspersonen unserer Arbeit quantitative Unterschiede (Abb. 17, 18, 19 und 20 / I und II Periode).

Ein "Defizit" in der Purinausscheidung nach Verabreichung von Allopurinol wurde von mehreren Autoren beobachtet (67, 80). Vor allem Personen mit hoher Harnsäureproduktion waren davon betroffen (35, 82). Zur Erklärung wurden Reutilisation von Hypoxanthin und Xanthin zum Aufbau von Nukleotiden bzw. eine Blockierung der Purinsynthese de novo durch Allopurinol oder sich anhäufende Nukleotide angeführt (61, 67).

Das Ferment Xanthinoxidase findet sich reichlich in der Leber und in der Mukosa des Dünndarms. Die Annahme, daß Allopurinol während seiner Resorption im Dünndarmepithel angereichert wird, bietet eine einfache Erklärung für die quantitative Elimination der exogenen Uratquote bei Zufuhr dieses Mittels.

Wir beobachteten unter Formeldiät bei Zulage von Allopurinol 400 mg/die und Purinderivaten (Inosin, G-M-P) 4 g/die (Abb. 19, 20 / II und III Periode) eine massive Zunahme der renalen Oxypurinausscheidung, gleichzeitig jedoch auch einen Anstieg von Serumharnsäure und renaler Harnsäureausscheidung, die nach Absetzen von Allopurinol noch weit übertroffen wurde, während die renale Oxypurinausscheidung auf die Ausgangswerte vor Gabe von Allopurinol zurückfiel. Bei den Versuchspersonen F_2 und F_4 (Abb. 17, 18) kam es dagegen weder zu einem Anstieg von Serumharnsäure oder renaler Harnsäureausscheidung. Dies war auch nicht zu erwarten, denn Versuchsperson F_2 erhielt außer Allopurinol 400 mg/die keinen weiteren Zusatz, diente also als Kontrolle, und Versuchsperson F_4 erhielt als Zulage die Pyrimidinbase Cytosin 4 g/die.

Pyrimidinbiosynthese: (Abb. 21, 22, 23, 24
Tabellen 14, 15)

1970 beobachteten Fox und Mitarbeiter (22) ebenso wie Kelley und Beardmore (41) eine vermehrte Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin im Harn von Patienten, denen Allopurinol verabreicht wurde. Dieser Anstieg beruht auf einer Hemmung der Orotidyl-Decarboxylase (ODC), die für die Umwandlung von Orotidin-5-Phosphat zu Uridin-5-Phosphat verantwortlich ist. Zöllner und Gröbner (89) sowie Gröbner und Zöllner (32) benutzten diese durch Allopurinol induzierte Orotacidurie als Modell, um beim Menschen den Einfluß verschiedener Purin- und Pyrimidinderivate auf die Pyrimidinbiosynthese zu untersuchen. Sie fanden 1971 (89), daß die orale Verabreichung von 4 g/die Ribonukleinsäure (RNS) zu einer deutlichen Verminderung der durch Allopurinol hervorgerufenen Orotacidurie führt.

Während dieser Versuche erhielten gesunde freiwillige Versuchspersonen zusätzlich zu einer purinarmen Formeldiät Allopurinol und RNS. Kontrollperioden unter Weglassen von RNS und/oder Allopurinol wurden durchgeführt.

Diese Versuchsanordnung wurde auch in den folgenden Ernährungsexperimenten beibehalten, wobei lediglich die streng purinarme Basisdiät durch eine isoenergetische purin- und pyrimidinfreie Formeldiät sowie RNS durch andere Substanzen ersetzt wurde.

Weitere Untersuchungen (91) und (32) ergaben, daß nicht nur RNS, sondern auch RNS-Hydrolysat sowie die in der RNS enthaltenen Nukleotide G-M-P, U-M-P und C-M-P (1 g/die) zu einer Reduktion der durch Allopurinol induzierten Orotacidurie führen. 1 g/die A-M-P übte dagegen keinen Effekt aus. Im Vergleich zu 4 g RNS und 4 g RNS-Hydrolysat war die Wirkung dieser Nukleotide geringer, da keine Aquivalenzdosen eingesetzt wurden. Um sie herauszufinden, wurden deshalb in den nächsten Experimenten höhere Nukleotiddosen verabreicht (32).

Dabei stellte sich heraus, daß 3 g U-M-P bezüglich der Beeinflussung der durch Allopurinol induzierten Orotacidurie 4 g RNS oder RNS-Hydrolysat wirkungsäquivalent sind sowie der Einfluß von A-M-P auf die Orotsäureausscheidung dosisabhängig ist (11).

Folgende Experimente ergaben, daß auch Nukleoside (Uridin, Cytidin, Adenosin, Guanosin) sowie Hypoxanthin eine Reduktion der durch Allopurinol hervorgerufenen renalen Orotsäureausscheidung bewirken.

Wir verabreichten unseren Versuchspersonen 4 g/die der zu untersuchenden Substanzen und erhielten folgende Ergebnisse: (Abb. 21, 22, 23, 24 - Hemmung - Abb. 25)

Inosin 4 g/die verursachte eine Hemmwirkung der renalen Orotsäureausscheidung von 37 %, was in etwa der Wirkung von 3 g/die I-M-P (34 %) einer früheren Arbeit entspricht (11).

G-M-P 4 g/die führte zu einer Hemmung von 24,5 %. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen, wonach bei Verabreichung von 1 g/die eine Reduktion von 50 % und bei Verabreichung von 3 g/die eine Hemmung von nur 4,1 % beobachtet wurden (32, 11).

Cytosin 4 g/die führte zu keiner Verminderung der durch Allopurinol induzierten Orotacidurie. Bei uns zeigte sich sogar ein Anstieg der renalen Orotsäureausscheidung von fast 9 %.

Die in diesen Versuchen gewonnenen Ergebnisse sprechen für eine Hemmung der Pyrimidinsynthese des Menschen durch verschiedene Purin- und Pyrimidinderivate. Diese Beeinflussung beruht möglicherweise auf einer Hemmung der Gutamin bevorzugenden Carbamylphosphat-Synthetase (CAPS 2), die in verschiedenen Säugetiergeweben ein Schlüsselenzym

bei der Regulation der Pyrimidinbiosynthese spielt (8). Eine andere Möglichkeit betrifft das Enzym Dihydroorotase, das in Säugetiergeweben von verschiedenen Purinen und Pyrimidinen gehemmt wird (12). Eine Beeinflussung der Orotidyl-Decarboxylase (ODC) der Erythrocyten durch 4 g/die RNS, 4 g/die RNS-Hydrolysat oder Purin- und Pyrimidinderivate in einer Dosierung von 1 g/die und 3 g/die (32, 11) konnte nicht beobachtet werden.

Unsere Arbeit (Abb. 26) zeigt keine Beeinflussung der Orotidyl-Decarboxylaseaktivität bei Verabreichung von 4 g/die G-M-P. Die Ergebnisse bei Verabreichung von 4 g/die Cytosin und 4 g/die Inosin könnten möglicherweise als Hemmung der Orotidyl-Decarboxylaseaktivität durch diese Substanzen gedeutet werden. - Betrachtet man jedoch alle Kurven gemeinsam, so fällt auf, daß sich für die ODC-Aktivität insgesamt sehr unterschiedliche Werte ergaben. Da die ODC-Aktivitätsbestimmung von Inosin und Cytosin rund ein 3/4 Jahr nach den beiden ersten ODC-Bestimmungen erfolgte, muß vermutlich ein lagerungsbedingter ($0^{\circ}C$) Aktivitätsverlust des Enzyms mit eingerechnet werden.

Eine mögliche Beeinflussung der Orotidyl-Decarboxylaseaktivität durch 4 g/die Cytosin und 4 g/die Inosin wird also fragwürdig bleiben.

Eine Hemmung der renalen Orotsäureausscheidung durch die erwähnten Purine und Pyrimidine ist unwahrscheinlich, da die physiologische Orotsäureausscheidung unter Normalkost durch purin- und pyrimidinfreie Diät nicht beeinflußt wird (33).

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Von Zöllner und Gröbner wurde 1971 (89) gezeigt, daß Ribonukleinsäure (RNS) die durch Allopurinol induzierte Orotacidurie vermindert. Weitere Untersuchungen (91, 32) ergaben, daß neben Ribonukleinsäure auch Ribonukleinsäure-Hydrolysat sowie die in der Ribonukleinsäure enthaltenen Nukleotide zu einer Reduktion der durch Allopurinol hervorgerufenen renalen Orotsäureausscheidung führen.

Die vorliegende experimentelle Arbeit beschreibt die Beeinflussung der durch Allopurinol induzierten Orotacidurie durch Guanosin-5-Monophosphat (G-M-P, Purinnukleotid), Inosin (Purinnukleosid) und Cytosin (Pyrimidinbase).

Vier gesunde Versuchspersonen erhielten 29 Tage eine purin- und pyrimidinfreie isoenergetische Formeldiät. Nach einer Beobachtungsperiode von 4 Tagen unter Formeldiät allein, wurden 400 mg/die Allopurinol zugelegt. Nach weiteren 10 Tagen erfolgte die zusätzliche Gabe von jeweils 4 g/die Guanosin-5-Monophosphat, Inosin oder Cytosin. Schließlich wurde Allopurinol abgesetzt und nur noch die zu untersuchenden Substanzen verabreicht. Eine Versuchsperson diente als Kontrolle.

Es wurden folgende Parameter zur Beurteilung von Purin- und Pyrimidinsynthese bestimmt:

- Harnsäure im Serum und Urin
- renale Ausscheidung der Oxypurine (Hypoxanthin + Xanthin) im Urin
- renale Ausscheidung der Orotsäure im Urin
- Aktivität der Orotidyl-Decarboxylase (ODC) aus gewaschenen Erythrocyten

Wir erhielten folgende Ergebnisse:

Pyrimidinsynthese

1. Die durch Allopurinol induzierte Orotacidurie wird bei Zulage von 4 g/die Inosin (Purinnukleosid) um 37 % und bei Zulage von 4 g/die Guanosin-5-Monophosphat (Purinnukleotid) um 24,5 % vermindert. Ein solcher Effekt war bei Zulage von 4 g/die Cytosin (Pyrimidinbase) nicht nachweisbar.
2. Eine Beeinflussung der Orotidyl-Decarboxylase (ODC) durch 4 g/die Guanosin-5-Monophosphat konnte nicht beobachtet werden. Hingegen kann eine mögliche Beeinflussung der Orotidyl-Decarboxylase durch Gabe von 4 g/die Cytosin und 4 g/die Inosin nicht ausgeschlossen werden.

Die in diesen Ernährungsversuchen gewonnenen Erkenntnisse sprechen für eine Hemmung der Pyrimidinsynthese des Menschen durch verschiedene Purin- und Pyrimidinderivate.

Diese Beeinflussung beruht vermutlich auf einer Hemmung der Glutamin-bevorzugenden Carbamylphosphat-Synthetase (8). Eine andere Möglichkeit betrifft das Enzym Dihydroorotase (12). - Eine Hemmung der renalen Orotsäureausscheidung selbst durch die besagten Purin- und Pyrimidinderivate scheint unwahrscheinlich (33).

Purinsynthese

3. Unsere Ergebnisse aus den Bestimmungen von Serumharnsäure, renaler Harnsäureausscheidung und renaler Oxypurinausscheidung unterstreichen weiterhin die von Zöllner und Gröbner 1970 (88) aufgestellte Hypothese zur Erklärung des "Purindefizits" nach Gabe von Allopurinol, wonach die Harnsäurebildung aus exogen zugeführten Purinen (bei uns Inosin und G-M-P) durch Allopurinol fast vollständig, die endogene Harnsäurebildung hingegen wesentlich weniger unterdrückt wird. Die Gabe von 4 g/die Cytosin blieb, wie zu erwarten, ohne Ergebnis.

Die Ergebnisse unterstreichen die enge Verknüpfung zwischen Purin- und Pyrimidinstoffwechsel.

6. A N H A N G

Tabellen
Abbildungen
des Ernährungsversuches

Abkürzungsverzeichnis

Literatur

Lebenslauf

Tabelle 11: Harnsäurebestimmung aus Urin u. Serum (mg/dl+m

Tage/Zeitp.			Kontrolle			Cytosin			GMP			Inosin		
			Urin	Serum		Urin	Serum		Urin	Serum		Urin	Serum	
1	0		286	4,3		491	5,9		406	4,3		404	4,4	
2			423			370			417			391		
3	2		—	2,1		328	4,9		311	3,7		185	4,2	
4	I	293	293		312	296		308	305		286	388		
5	4		316	1,9		392	4,0		277	1,2		364	3,9	
6			280			355			251			263		
7	6		240	1,7		268	4,1		192	1,1		222	3,0	
8			238			239			160			212		
9	8		294	1,6		183	4,3		223	1,0		190	2,6	
10			203			239			154			127		
11	10		293	1,3		200	4,1		225	1,6		137	1,9	
12	I		122			174			149			103		
13	12		269	1,9	203	245	4,1	136	96	1,6	138	147	1,9	
14			269			193			73			164		
15	14		189	1,6		196	3,4		274	3,9		287	2,1	
16			246			153			363			221		
17	16		221	1,4		226	3,0		511	4,0		333	2,3	
18			198			174			478			239		
19	18		248	1,4		208	3,0		466	4,2		292	3,0	
20			197			135			489			267		
21	20	220	210	1,5		148	3,1		359	4,1		319	3,4	
22	II		201			193			488			239		
23	22		290	1,4	168	162	3,2	427	390	4,0	269	274	3,6	
24			203			168			472			246		
25	24		163	3,5		185	2,9		715	5,5		328	4,3	
26			318			248			826			365		
27	IV		278			210			1214			549		
28	27	225	208	4,0	194	184	3,5		949	5,8	611	686	7,0	
29			189			187		1087	1099			600		

Tabelle 12: Oxypurinbestimmung aus Urin (mg HS/d)

	Tage	Kontrolle		Cytosin		GMP		Inosin	
I	1	-9		61		-7		-35	
	2	-17		0		+2		+17	
	3	-	0	20	31	-15	0	24	27
	4	-13		42		-7		31	
II	5	7		37		18		-2	
	6	8		157		55		49	
	7	29		113		47		73	
	8	23		131		115		66	
	9	27		94		17		7	
	10	17		156		84		50	
	11	52		162		154		53	
	12	36		234		132		76	
	13	18	187	249	132	185	56	39	
	14	42		103		58		57	
III	15	52		64		388		353	
	16	56		119		372		473	
	17	47		144		494		399	
	18	23		158		442		308	
	19	13		155		433		517	
	20	49		113		574		453	
	21	44	41	98		531		562	
	22	21		69	104	497	486	649	601
	23	41		139		434		684	
	24	60		108		484		509	
IV	25	24		57		119		348	
	26	27		19		56		269	
	27	6		24		50		85	
	28	2	2	5	17	44	49	32	39
	29	-2		23		52		-36	

Tabelle 13: Gesamtpurinausscheidung (mg/d)

Tage		Kontrolle		Cytosin		GMP		Inosin	
1		277		552		399		369	
2		406		369		419		408	
3	I	0		348		295		209	
4		280	280	338	343	298	296	419	314
5		323		429		295		362	
6		288		512		306		312	
7		269		381		239		295	
8		261		370		275		278	
9		321		277		240		197	
10		220		395		238		177	
11		345		362		379		190	
12		158		408		281		179	
13	II	287	390	494	268	281	194	186	
14		311		296		131		221	
15		241		260		662		640	
16		302		272		735		694	
17		268		370		1005		732	
18		221		332		920		547	
19		261		363		899		809	
20		246		248		1063		720	
21	III	254		246		890		881	
22		222		262		985		888	
23		331	261	301	271	824	914	958	870
24		263		276		956		755	
25		187		242		834		676	
26		345		267		882		634	
27	IV	284		234		1264		634	
28		210		189		993		718	
29		187	227	210	211	1151	1136	636	663

Tabelle 14: Orotsäurebestimmung aus Urin (mg/d)

Tage		Kontrolle		Cytosin		GMP		Inosin	
1			0,4		1,6		3,2		2,1
2			1,1		2,3		3,9		0,8
3	I		–		2,2		6,9		1,6
4		0,3	0,3	2,1	2,1	5,5	4,2	1,4	1,2
5			5,0		6,1		8,8		4,4
6			7,1		11,2		18,9		11,7
7			12,2		19,4		21,3		9,1
8			11,4		12,0		23,4		17,2
9			15,4		17,2		26,2		26,5
10			13,6		31,1		26,4		27,9
11			18,6		18,0		23,0		20,7
12			11,4		12,7		22,0		17,1
13	II		18,7	18,0	18,6	22,1	22,0	21,5	23,7
14			13,6		21,7		21,5		24,7
15			17,1		20,6		21,8		18,5
16			13,7		21,2		16,8		12,0
17			14,2		20,9		21,8		20,4
18			14,4		22,8		19,0		8,4
19			16,7		19,3		17,0		15,8
20			17,2		12,6		15,8		19,6
21			11,9		17,6		16,1		9,0
22	III	16,0	17,5	19,6	19,8	16,7	18,3	13,5	16,4
23			19,6		23,7		17,7		20,8
24			17,8		17,3		14,7		7,8
25			5,7		12,2		12,3		6,5
26			3,4		6,3		6,0		3,1
27			1,9		3,0		3,8		2,1
28	IV	1,5	1,1	1,5	0,3	3,2	4,4	1,9	1,9
29			1,4		1,3		1,6		1,8

Tabelle 15: ODC - Bestimmung ausgew. Erytrocyten (nMd/mg/9

	Tage	Kontrolle	Cytosin	GMP	Inosin
I	1 0	0,368	0,051	0,307	0,074
	2				
	3 2	0,397	0,059	0,275	0,082
	4				
	5 4	0,487	0,069	0,420	0,114
	6				
	7 6	0,466	0,061	0,406	0,099
	8				
	9 8	0,478	0,093	0,509	0,123
	10				
	11 10	0,484	0,084	0,466	0,119
	12				
II	13 12	0,576	0,107	0,583	0,156
	14				
	15 14	0,561	0,158	0,506	0,131
	16				
	17 16	0,548	0,117	0,598	0,149
	18				
	19 18	0,632	0,064	0,534	0,052
	20				
	21 20	0,604	0,084	0,596	0,029
	22				
III	23 22	0,765	0,089	0,603	0,037
	24				
	25 24	0,800	0,109	0,572	0,072
	26				
	27				
IV	28 27	0,780	0,115	0,540	0,162
	29				

Abb.17

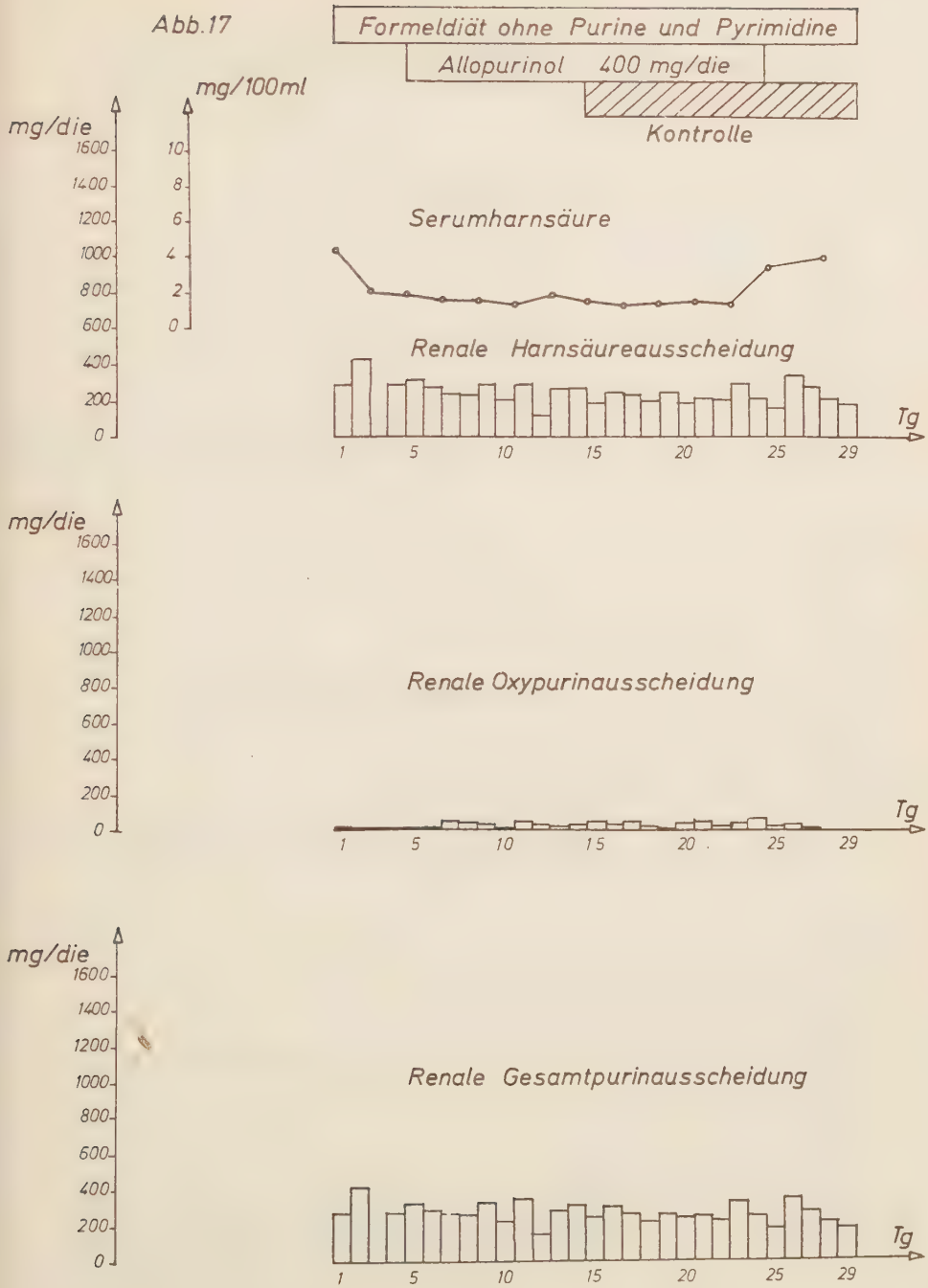

Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
Kontrolle
mg/die
mg/100ml
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
8
6
4
2
0
Serumharnsäure
Renale Harnsäureausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29
mg/die
Renale Oxypurinausscheidung
Tg
mg/die
Renale Gesamtpurinausscheidung
Tg

Abb.18

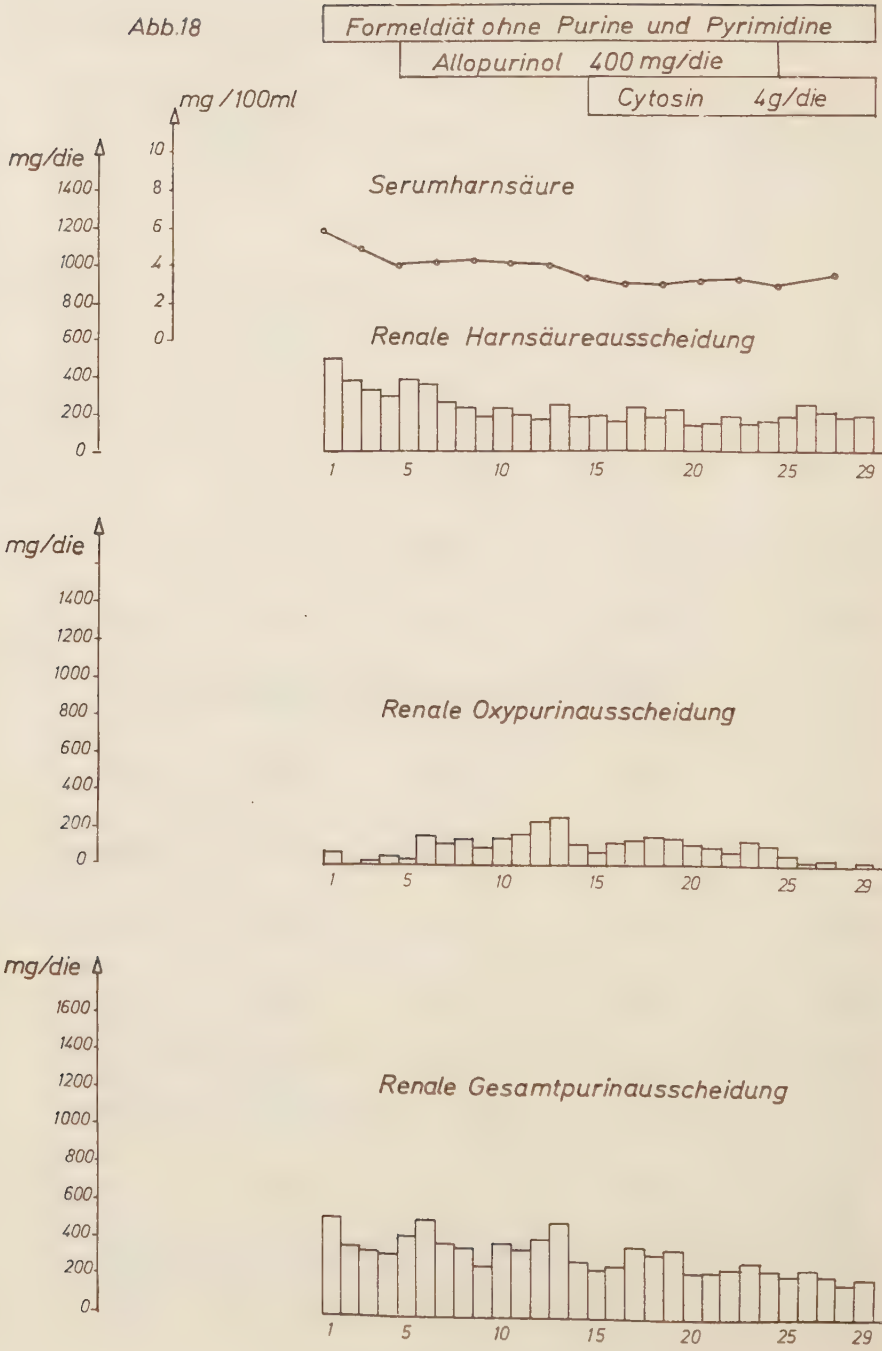

Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
Cytosin 4g/die
mg/100ml
mg/die
10
8
6
4
2
0
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Serumharnsäure
Renale Harnsäureausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29
mg/die
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Renale Oxypurinausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29
mg/die
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Renale Gesamtpurinausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29

Abb. 19

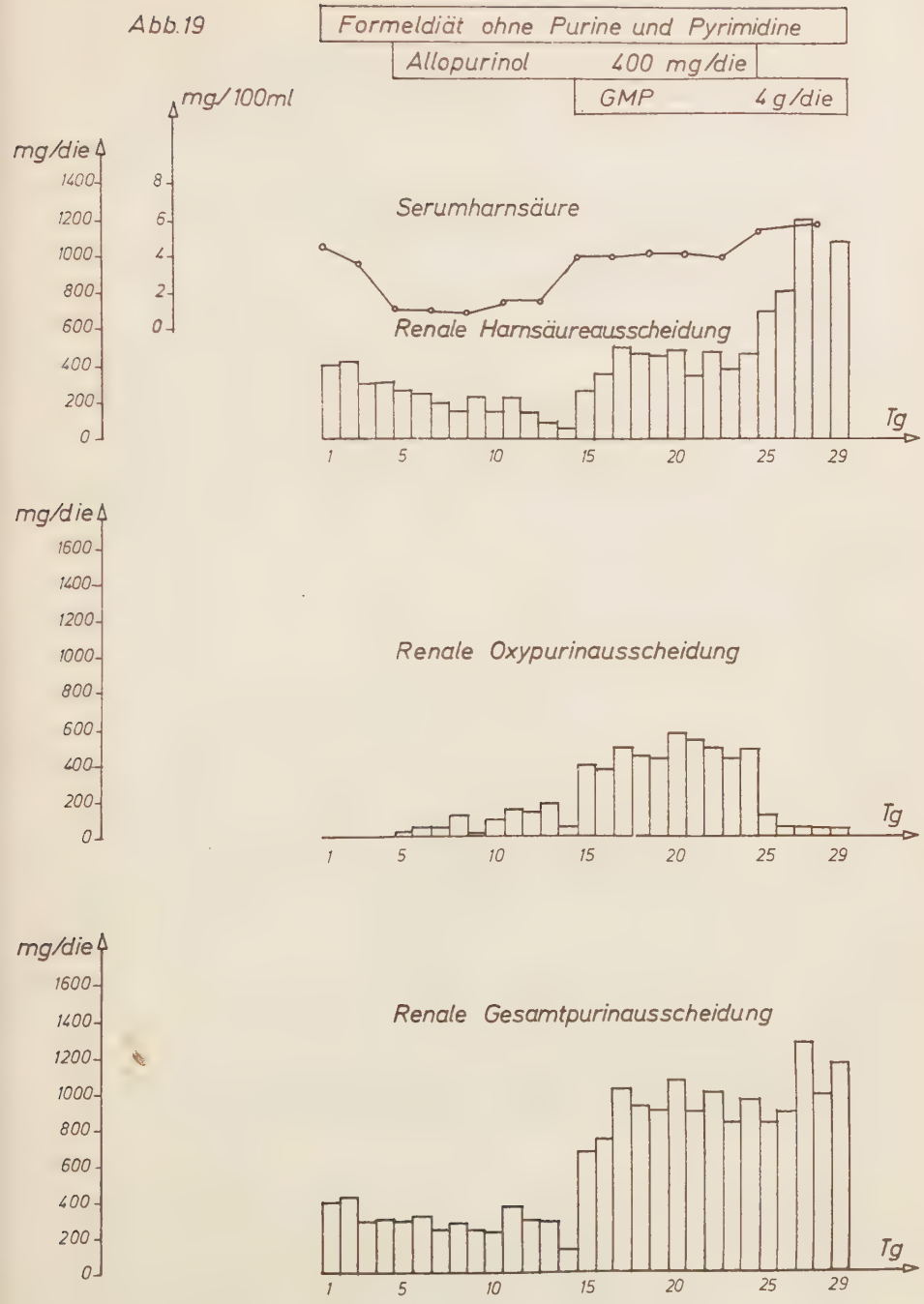
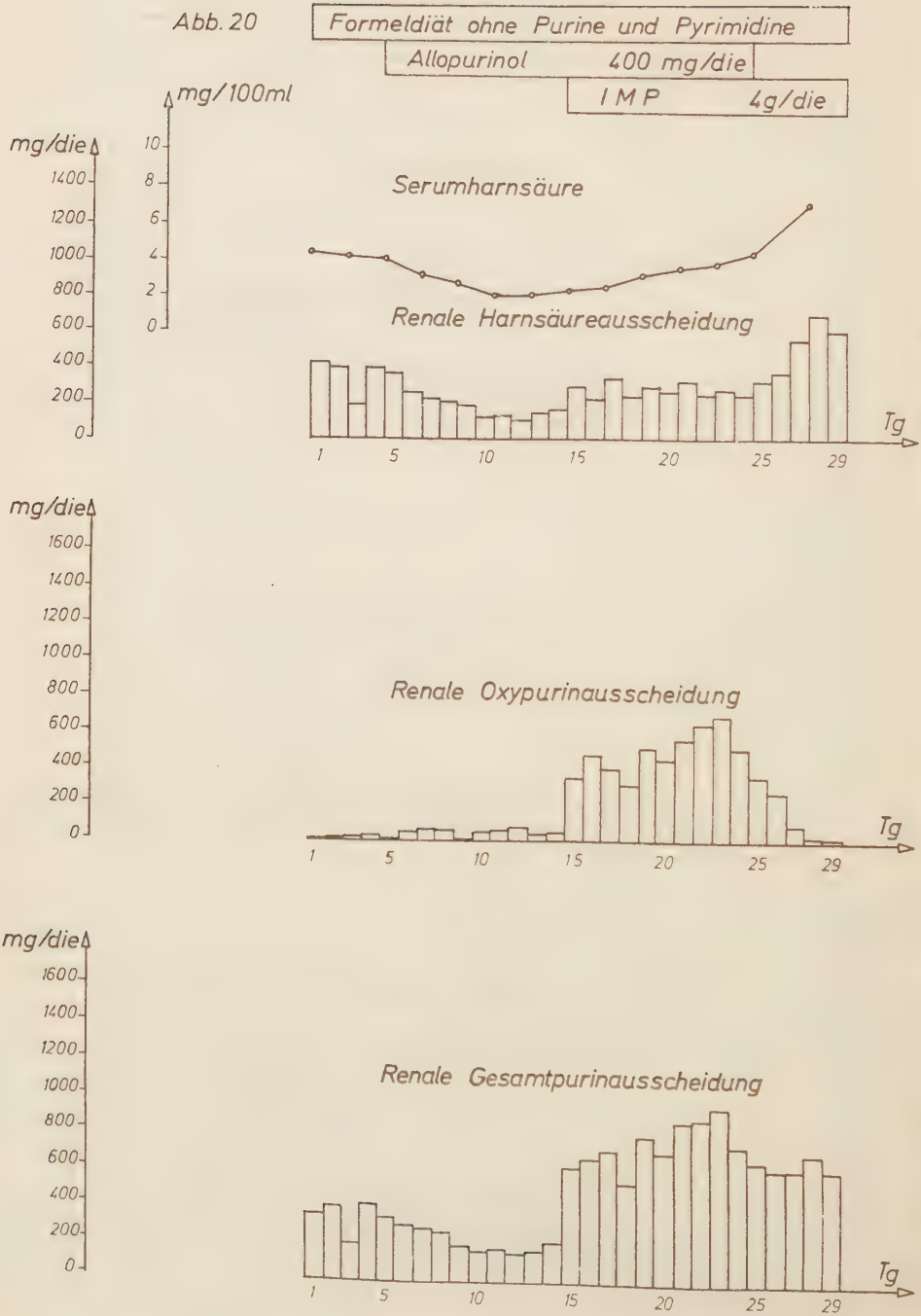

Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
GMP 4 g/die
mg/100ml
mg/die
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
8
6
4
2
0
Serumharnsäure
Renale Harnsäureausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29
mg/die
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Renale Oxypurinausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29
mg/die
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Renale Gesamtpurinausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29

Abb. 20


Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
IMP 4g/die
mg/100ml
mg/die
Serumharnsäure
Renale Harnsäureausscheidung
Tg
Renale Oxypurinausscheidung
Renale Gesamtpurinausscheidung
1
5
10
15
20
25
29

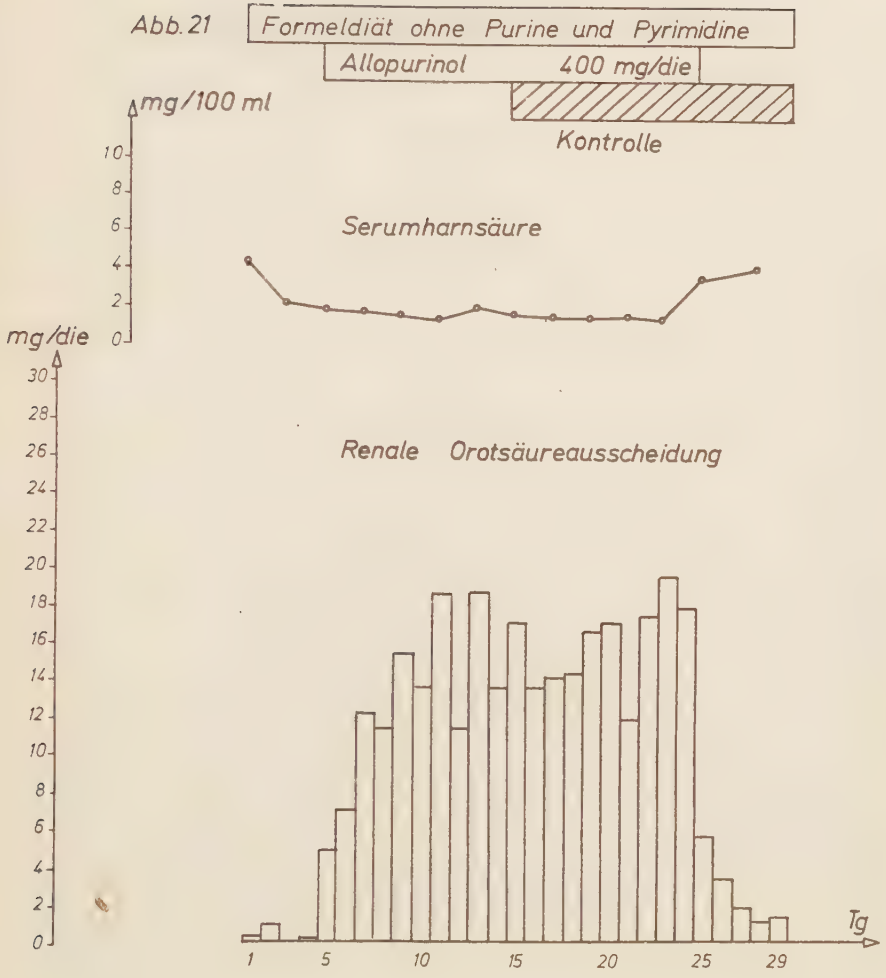


Abb. 21
Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
Kontrolle
mg/100 ml
10
8
6
4
2
0
Serumharnsäure
mg/die
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Renale Orotsäureausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29

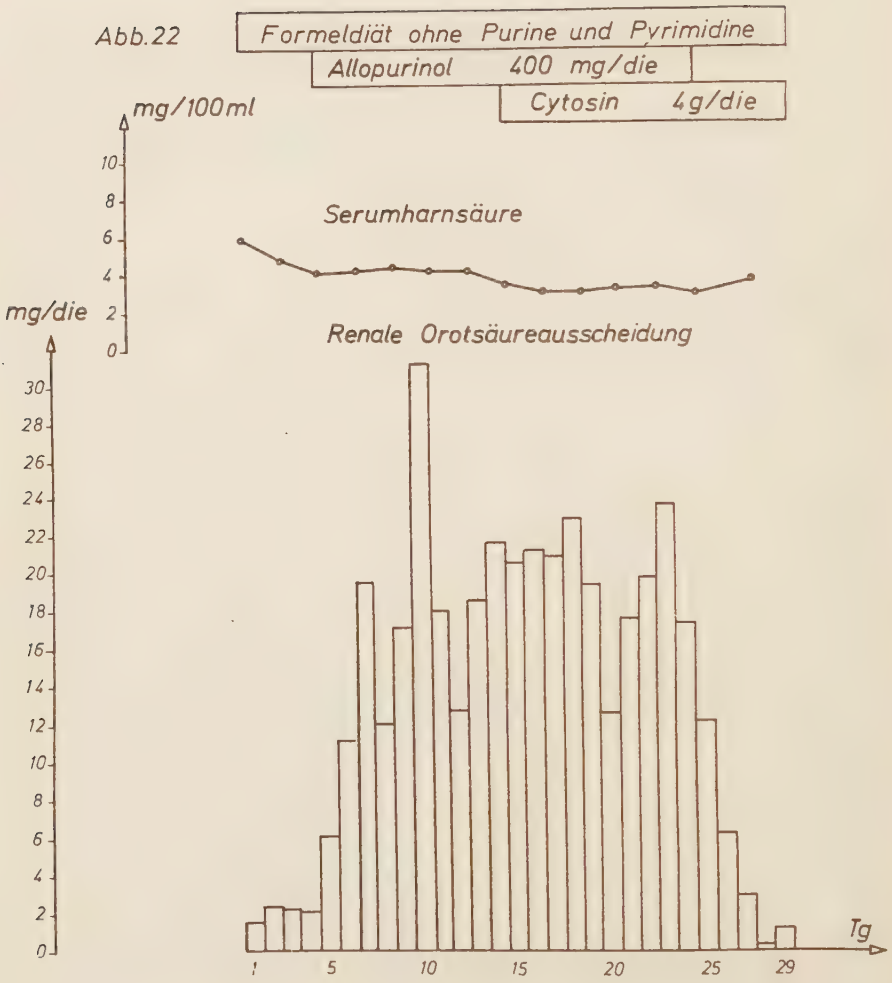


Abb.22
Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
Cytosin 4g/die
mg/100ml
10
8
6
4
2
0
Serumharnsäure
mg/die
Renale Orotsäureausscheidung
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Tg
1
5
10
15
20
25
29

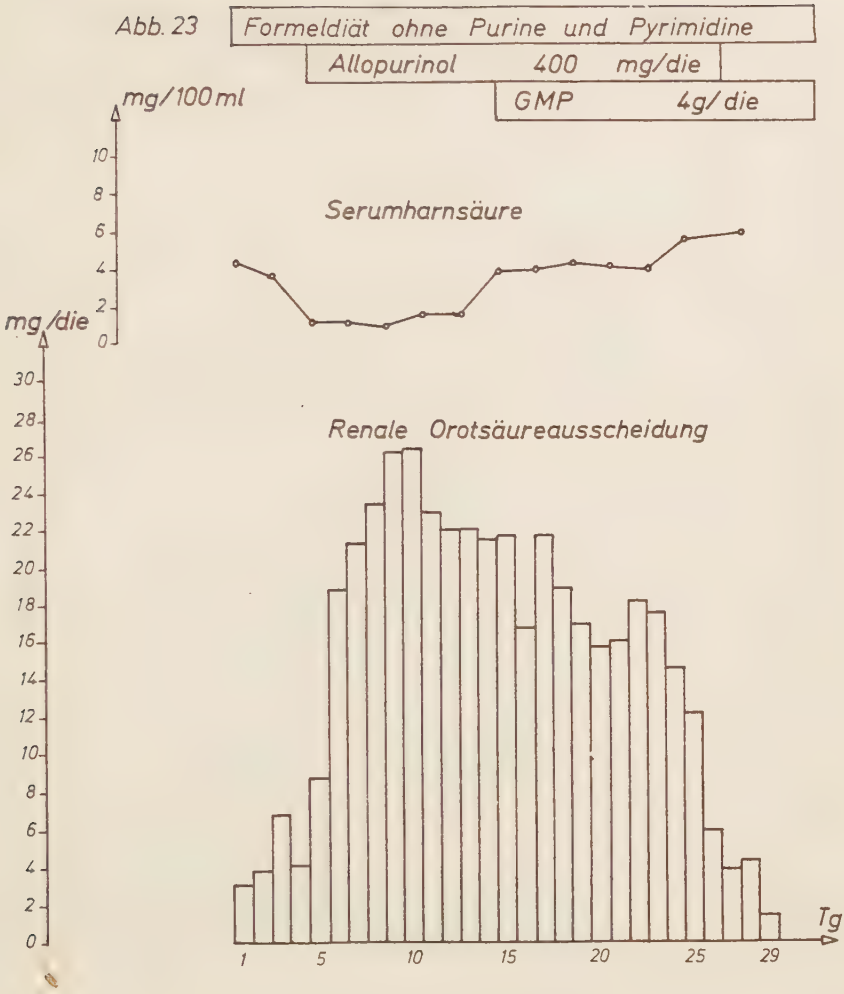


Abb. 23
Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
GMP 4g/die
mg/100ml
10
8
6
4
2
0
Serumharnsäure
mg/die
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Renale Orotsäureausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29

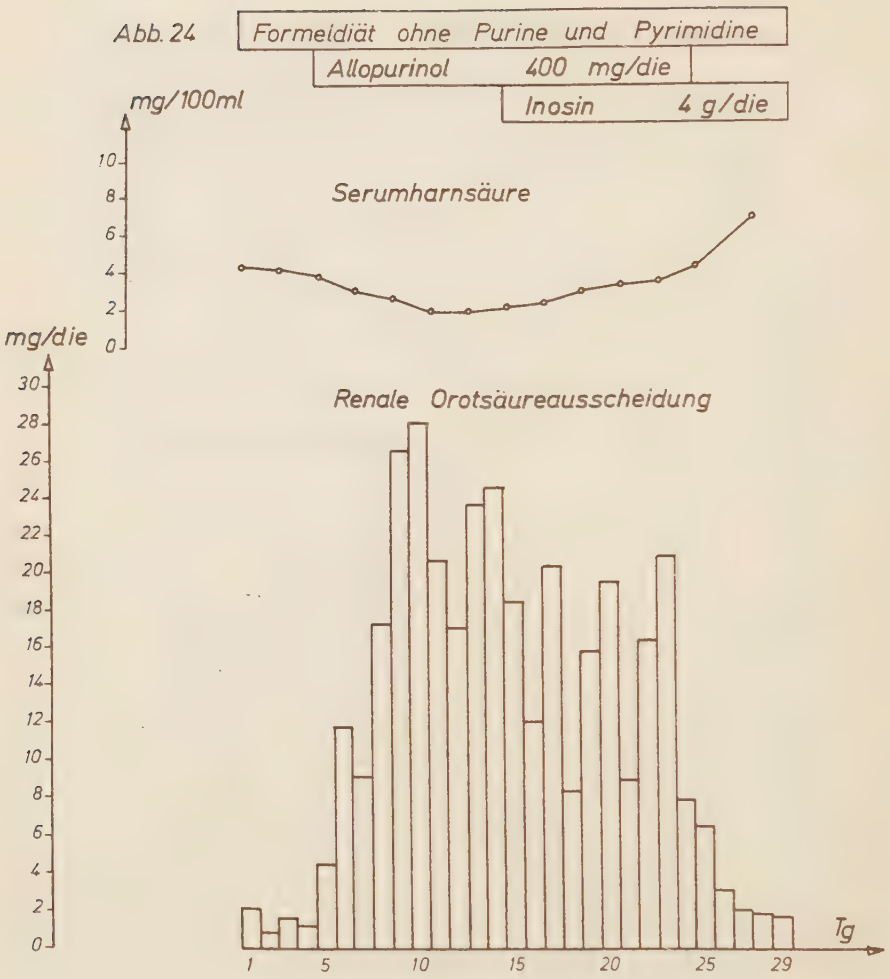


Abb. 24
Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
Inosin 4 g/die
mg/100ml
10
8
6
4
2
0
Serumharnsäure
mg/die
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Renale Orotsäureausscheidung
Tg
1
5
10
15
20
25
29

Abb. 25 Hemmung der Orotazidurie

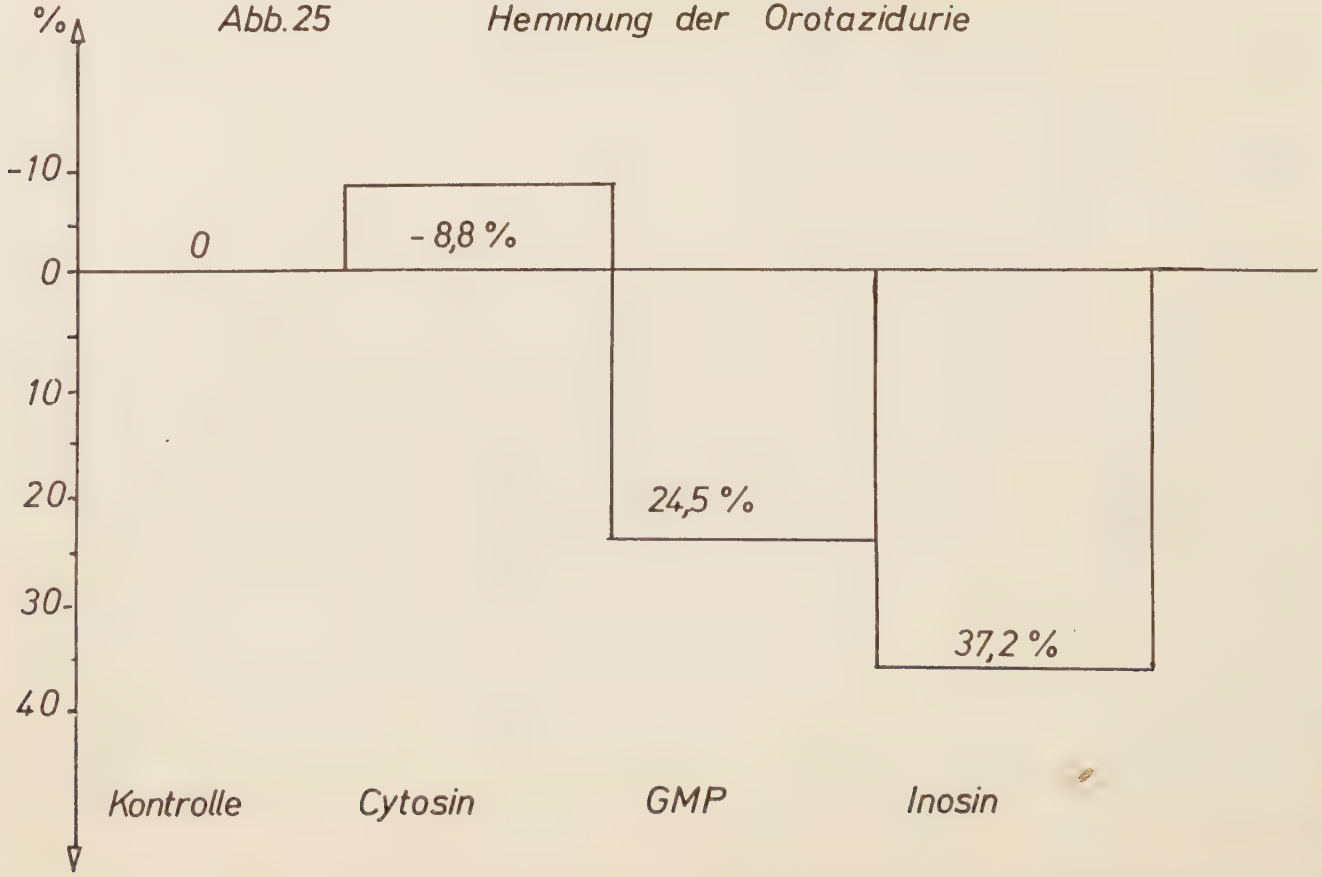
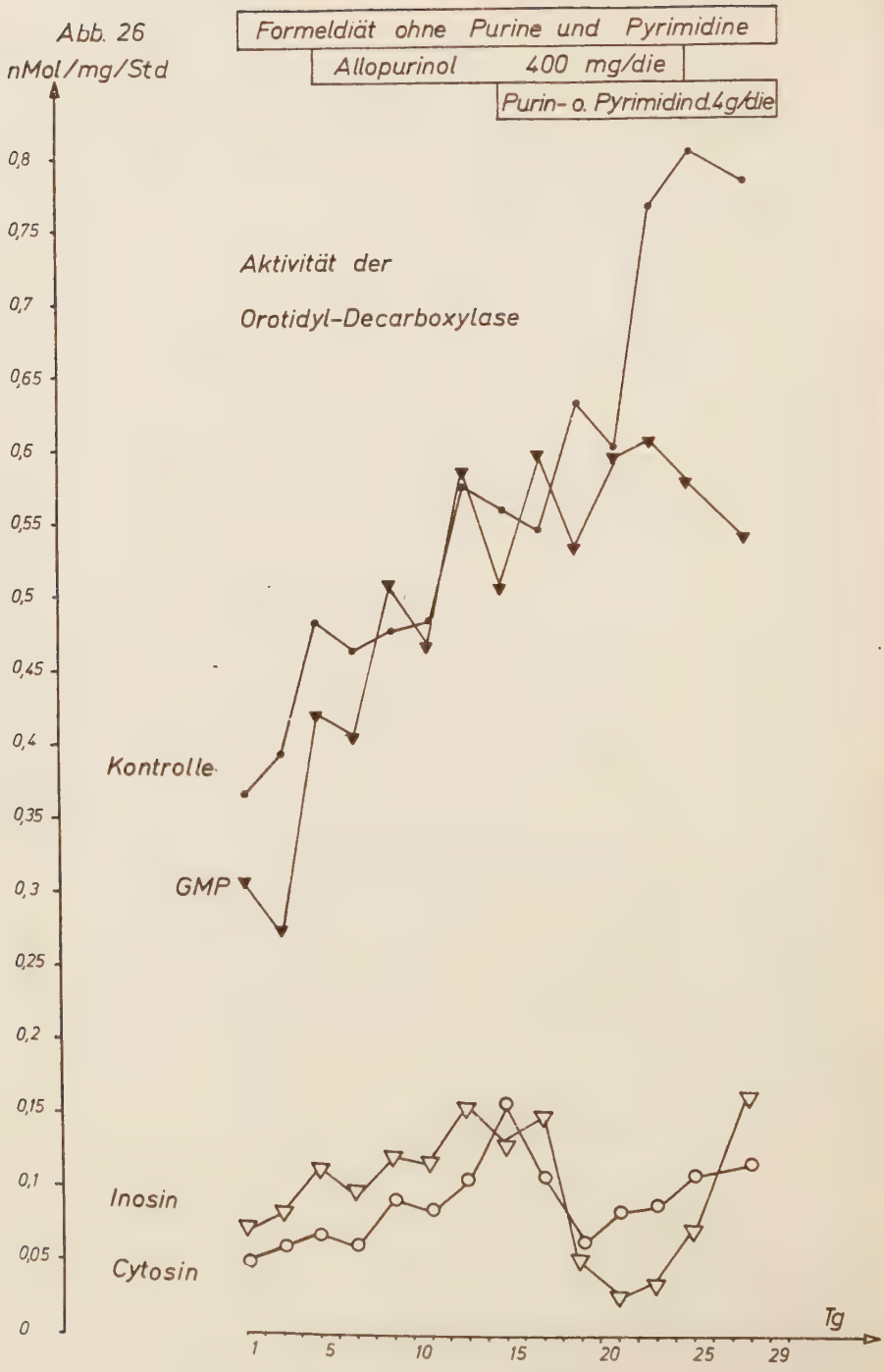


Abb. 26


Formeldiät ohne Purine und Pyrimidine
Allopurinol 400 mg/die
Purin- o. Pyrimidind. 4g/die
nMol/mg/Std
0,8
0,75
0,7
0,65
0,6
0,55
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
Aktivität der
Orotidyl-Decarboxylase
Kontrolle
GMP
Inosin
Cytosin
Tg
1
5
10
15
20
25
29

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenin-5-Monophosphat
ATP	Adenin-5-Triphosphat
APRT	Adenin-Phosphoribosyl-Transferase
ß-AIBA	ß-Aminoisobutyrat
CAPS	Carbamylphosphat-Synthetase
CMP	Cytidin-5-Monophosphat
CDP	Cytidin-5-Diphosphat
CTP	Cytidin-5-Triphosphat
cpm	counts per minute
E_F	Eigenextinktion
E_{HS}	Harnsäureextinktion
GMP	Guanin-5-Monophosphat
GTP	Guanin-5-Triphosphat
HS	Harnsäure
HV	Harnvolumen
HX	Hypoxanthin
HGPRT	Hypoxanthinguaninphosphoribosyl-Transferase
Ino	Inosin
IMP	Inosin-5-Monophosphat
OS	Orotsäure
OMP	Orotidin-5-Monophosphat
ODC	Orotidin-5-Phosphat-Decarboxylase = Orotidyl-Decarboxylase
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
RNS	Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle

U	Uricase
UMP	Uridin-5-Monophosphat
UDP	Uridin-5-Diphosphat
UTP	Uridin-5-Triphosphat
VP	Versuchsperson
X	Xanthin
XO	Xanthinoxidase

SHS	Serumharnsäure
RHS	renale Harnsäureausscheidung
ROXY	renale Oxypurinausscheidung
ROS	renale Orotsäureausscheidung

Literaturverzeichnis

1. ADACHI,T.,TANIMURA,A.,and ASAHINA,M.:
A colorimetric determination of orotic acid.J.Vitamin., 9: 217 (1963)

2. APPEL,S.H.: Purification and kinetic properties of brain orotidine 5'-phosphate-decarboxylase.J.Biol.Chem., 243: 3924 (1968)

3. APPEL,S.H.,SILBERBERG,D.H.:
Pyrimidine synthesis in Tissue cultured.J.Neurochem., 15: 1437 (1968)

4. BEARDMORE,T.D.,CASHMAN,J.S.KELLEY,W.N.:
Mechanism of allopurinol-mediated increase in enzyme activity in man.J.clin.Invest., 15: 1823 (1972)

5. BEARDMORE,T.D.,FOX,I.H.,KELLEY,W.N.:
Effect of allopurinol on pyrimidine metabolism in Lesh-Nyhan-Syndrome. Lancet, II: 830 (1970)

6. BEARDMORE,T.D.,KELLEY,W.N.:
Mechanism of allopurinol-mediated inhibition of pyrimidine biosynthesis. J.Lab.clin.Med., 78: 696 (1971)

7. BECROFT,D.M.O.,PHILLIPS,L.I.:
Hereditary orotic aciduria and megaloblastic anaemie: A second case with response to uridine. Brit.med.J., 1: 547 (1965)

8. BLAKELY,R.L.,VITOLS,E.:
The control of nucleotide biosynthesis.A.Rev.Biochem. 37: 201-224 (1968)

9. BOOTHBY,W.M.,BERKSON,J.und DUNN,J.E.
Amer.J..Physiol., 116: 468 (1936)

10. BRÄUER,H.,VETTER,G.,WENIGER,W.,WÖSSNER,W.:
Ein Beitrag zur Dosierung von Allopurinol in der Langzeit-therapie der Hyperuricämie. Therapiew., 27: 3213 (1977)

11. BREHER,B.O.: Der Einfluß von Purin- und Pyrimidinnukleotiden auf die durch Allopurinol induzierte Orotacidurie. Dis. (1980)

12. BRESNICK,E.,BLATCHFORD,K.:
Inhibition of dihydroorotase by purines and pyrimidines.Biochem. biophys.Acta, 81: 150 (1964)

13. CASKEY,C.T.,ASHTON,D.M.,WYNGAARDEN,J.B.:
Enzymology of feedback-inhibition of glutamine-phophoribosyl-pyrophosphateamidotransferase by purineribonukleotides.J.biol. Chem., 239: 2570 (1964)

14. CHALMERS,R.A.,KRÖMER,H.,SCOTT,I.T.WATTS,R.W.E.:
A comparative study of xanthine-oxydase inhibitors allopurinol and oxipurinol in man.Clin.Sci., 35: 353-362 (1968)

15. DECKER,K.,KEPPLER,D.,PAUSCH,J.:
The regulation of pyrimidine nukleotide level and its role in experimental hepatitis. Advanc. Enzyme Regulat., II: 205 (1973)

16. DELBARRE,F.,AMOR,B.,ANSCHER,C.,DE GERY,A.:
Treatment of gout with allopurinol, a study of 106 cases.Ann.rheum. Dis., 25: 627 (1966)

17. DU BOIS,D.,und Du Bois,E.F.:
Arch.Intern.Med., 17: 863 (1916)

18. ELION,G.B.,CALLAHAN,S.,NATHAN,H.,BIEBER,S.,RUNDLES,R.W., HITCHINGS,G.H.:
Enzymatic and metabolic studies with allopurinol.Ann.rheum.Dis., 25: 608 (1966)

19. EMMERSON,B.T.: Discussion.Symposion on allopurinol.Ann.rheum.Dis., 25: 622 (1966)

20. FOLLMANN,H.: Die enzymatische Ribonukleotid-Reduktion: Biosyntheseweg der Desoxyribonukleotide.Angew.Chem., 86: 624 (1974)

21. FOX,I.H.,WYNGAARDEN,J.B.,KELLEY,W.N.: Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate in man, a newly observed effect of allopurinol.New Engl.J.Med., 283: 1177 (1970)

22. FOX,R.M.,ROYSE-SMITH,D.,O'SULLIVAN,W.J.: Orotiduria induced by allopurinol. Science, 168: 861 (1970)

23. FOX,R.M.,WOOD,M.H.,O'SULLIVAN,W.J.: Studies on the coordinate activity and lability of orotidylate phosphoribosyltransferase and decarboxylase in human erythrocytes, and the effects of allopurinol administration.J.clin.Invest., 50: 1050 (1971)

24. FOX,R.M.WOOD,M.H.,O'SULLIVAN,D.,O'SULLIVAN,W.J.:
Hereditary orotic aciduria:
Types I and II.Amer.J.Med.,
55: 791 (1973)

25. FOX,I.H.: Purine ribonukleotide catabolism:
Clinical and biochemical significance.
Nutr.Metabol., 16: 65 (1974)

26. GOODMAN,L.S.,GILMAN,A.:
The pharmacological basis of
therapeutics, 4th ed.: The Macmillan
Company 1971

27. GRÖBNER,W.,ZÖLLNER,N.:
Epidemiologie und Pathophysiologie
der Gicht. Fettsucht-Gicht (Thieme-
Verlag): 125-138 (1971)

28. GRÖBNER,W.,ZÖLLNER,N.:
Zur Beeinflussung der Purin- und
Pyrimidinsynthese durch Allopurinol.
Klin.Wschr., 53: 255-260 (1975)

29. GRÖBNER,W.,KELLEY,W.N.,ZÖLLNER,N.:
Zum Einfluß von Allopurinol auf den
Pyrimidinstoffwechsel.Verh.Dtsch.
Ges.Inn.Med., 80: 1235 (1974)

30. GRÖBNER,W.,ZÖLLNER,N.:
Störungen des menschlichen Pyrimi-
dinstoffwechsels.Münchn.med.Wschr.,
37: 117 (1975)

31. GRÖBNER,W.,KELLEY,W.N.:
Effect of allopurinol and its metabolic derivatives on the configuration of human orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-phosphate-decarboxylase.Biochem.Pharmacol., 24: 379-384 (1975)

32. GRÖBNER,W.,ZÖLLNER,N.:
The influence of dietary purines and pyrimidines on purine and pyrimidine biosynthesis in man. Nutr.Metab., 21: 26-32 (1977)

33. GRÖBNER,W.,ZÖLLNER,N.:
Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine, in: Biochemie und Physiologie der Ernährung, Bd. I (Thieme), Stuttgart: 341 - 357 (1980)

34. HAGER,S.E.,JONES,M.E.:
Inital steps in pyrimidine synthesis in Ehrlich ascites carcinoma in vitro.J.Biol.Chem., 240: 4456 (1965)

35. HITCHINGS,G.H.: Effect of allopurinol in relation to purine biosynthesis. Ann.rheum. Dis., 25: 601 (1966)

36. HOLMES,E.W.,MC DONALD,J.A.,MC CORD,J.M., WYNGAARDEN,J.B.,KELLEY,W.N.: Human glutamine phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransferase: Kinetic and regulatory properties. J.Biol.Chem., 248: 144 (1973)

37. HUGULEY,C.M.,BRAIN,J.A.,RIVERS,S.L.,SCOGGINS,R.B.: Refractory megaloblastic anemia associated with excretion of orotic acid.Blood, 14: 615 (1959)

38. ITO,K.,NAKANISHI,S.,TERADA,M.,TATIBANA,M.: Biochim.biophys.Acta, 220: 477 (1970)

39. JONES,M.E.: Regulation of Pyrimidine and Arginine: Biosynthesis in Mammals. Adv.Enzyme Regulat., 9: 19 (1971)

40. KASBEKAR,D.K.,NAGABHUSHAMAN,A.,GREENBERG,D.M.: Purification and properties of orotic acid-decarboxylating enzymes from calf thymus.J.Biol.Chem., 239: 4245 (1964)

41. KELLEY,W.N.,BEARDMORE,T.D.:
Allopurinol: Alteration in pyrimidine metabolism in man. Science, 169: 388 (1970)

42. KELLEY,W.N.,ROSENBLOOM,F.M.,MILLER,J., SEEGMILLER,J.E.:
An enzymatic basis for variation in response to allopurinol. Hypoxanthin-guanosin-phosphoribosyltransferase-deficiency. New Engl.J.Med., 278: 287 (1968)

43. KELLEY,W.N.,WYNGAARDEN,J.B.:
Effects of dietary purine restriction, allopurinol and oxipurinol on the urinary excretion of ultraviolet-absorbing compounds. Clin.Chem., 16: 707 (1970a)

44. KELLEY,W.N.,WYNGAARDEN,J.B.:
Effects of allopurinol and oxipurinol on purine synthesis in cultured human cells.J.clin.Invest., 49: 602 (1970b)

45. KELLEY,W.N.,GRÖBNER,W.,HOLMES,E.:
Current concepts in the pathogenesis of hyperuricemia.Metabolism, 22: 939 (1973)

46. KELLEY,W.N.,GREENE,M.L.,FOX,I.H.,ROSSENBLOOM,F.M., LEVY,R.J.,SEEGMILLER,J.E.:
Effects of orotic acid on purine and lipoprotein metabolism in man. Metabolism, 19: 1025 (1970)

47. KELLEY,W.N.: Purine and pyrimidine metabolism of cells in culture.Growth, Nutrition and Metabolism in cells in culture. Academic.Press.Inc., I,New York (1972)

48. KERSON,L.A.,APPEL,S.H.:
Kinetic studies on rat liver carbamyl phosphate synthetase. J.biol.Chem., 243: 4279 (1968)

49. KLINENBERG,J.R.,GOLDFINGER,S.E.,SEEGMILLER,J.E.:
The effectiveness of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout. Ann.intern. Med., 62: 639 (1965)

50. KLINENBERG,J.R., et al.:
An enzymatic spectophotometric method for the determination of xanthine and hypoxanthine.Clin. Chem., 13: 834 (Okt. 1967)

51. KRENITSKY,T.A.,ELION,G.B.,STRELITZ,R.A., HITCHINGS,G.H.:
Ribonukleosides of allopurinol and oxo-allopurinol.J.biol.Chem., 242: 2675 (1967)

52. LEVENBERG,B.: Role of L-glutamine as donor of carbamyl nitrogen for the enzymatic synthesis of citrulline in Agaricus bisporus.J.Biol.Chem., 237: 2590-8 (1962)

53. LÖFFLER,G.: Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine,13,in: Physiologische Chemie,1.Aufl. (Springer),Berlin: 453-471 (1975)

54. LOTZ,M.,FALLON,H.J.,SMITH,L.H.,Jr.:
Excretion of orotic acid and orotidine in heterocygotes of congenital orotic aciduria. Nature, 197: 194 (1963)

55. MC COLLISTER,R.J.,GILBERT,W.R.,ASHTON,D.M., WYNGAARDEN,J.B.:
Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mercapto-purine-ribonucleotide and other purine-analogues.J.biol.Chem., 239: 1560 (1964)

56. MERTZ,D.P.: Risikofaktor Gicht. Studienreihe Boehringer Mannheim (1973)

57. MÜLLER,M.M.,KAISER,E.: Regulation of purine metabolism and its modification by drugs. Dtsch.Med.Wschr., 100(5): 198 (1975)

58. MURRAY,A.W.: The biological significance of purine salvage.Ann.Rev.Biochem., 40: 811 (1971)

59. NEIMANN,N.,NAJEAN,Y.,SCIALOM,C.,BOULARD,M., PIERSON,M.,BERNARD,J.: Etude d'un cas d'anémie megaloblastique de l'enfant avec excrétion anormale d'acide-orotique.Nouv.Rev.Franc. Hémat., 5: 445-457 (1965)

60. OTT,T.: Pharmacological and electrophysiologic effects of orotic acid compounds.Pharmazie, 34(5-6): 307 (1979)

61. POMALES,R.,BIEBER,S.,FRIEDMANN,R.,HITCHINGS,G.H.: Augmentation of incorporation of hypoxanthine into nucleic acids by administration of inhibitor of xanthine oxidase.Biochim.biophys. Acta, 72: 119 (1963)

62. POMALES,R.,ELION,G.B.,HITCHINGS,G.H.:
Xanthine as precursor of nucleic acid purines in mouse. Biochim. biophys.Acta, 95: 505 (1965)

63. RAJALAKSHMI,S.,HANDSCHUMACHER,R.E.:
Control of purine biosynthesis de novo by orotic acid in vivo and in vitro. Biochim.biophys. Acta, 155: 317-325 (1968)

64. ROGERS,L.E.,WARFORD,L.R.,PATTERSON,R.B.,PORTER,F.S.:
Hereditary orotic aciduria: I, A new case with family studies.Pediatrics, 42: 415 (1968)

65. ROGERS,L.E.,PORTER,F.S.:
Hereditary orotic aciduria: II, A urinary screening test. Pediatrics, 42: 423 (1968)

66. RUNDLES,R.W.,WYNGAARDEN,J.B.,HITCHINGS,G.H., ELION,G.B.,SILBERMAN,H.R.:
Effects of a xanthine oxidase inhibitor on thiopurine metabolism, hyperuricemia and gout.Trans. Ass.Amer.Physic., 76: 126 (1963)

67. RUNDLES,R.W.,SILBERMAN,H.R.,HITCHINGS,G.H., ELION,G.B.:
Effects of xanthine oxidase inhibitor on clinical manifestation and purine metabolism in gout.Ann. intern.Med., 60: 717 (1964)

68. RUNDLES,R.W.,METZ,E.N.,SILBERMAN,H.R.:
Allopurinol in the treatment of gout.Ann.intern.Med., 64: 229 (1966)

69. RUNDLES,R.W.: Metabolic effects of allopurinol and alloxanthine.Ann.rheum.Dis., 25: 615-620 (1966)

70. SCHWARZMEIER,J.D.:
Studies on purine de novo synthesis and cyclic AMP in normal and pathologic leucocytes.Wien.klin.Wschr., 86(23): 716 (1974)

71. SEEGMILLER,J.E.,ROSENBLOOM,F.M.,KELLEY,W.N.:
Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis.Science, 155: 1682 (1967)

72. SMITH,L.H.: Pyrimidine metabolism in man.New Engl.J.Med., 288: 764 (1973)

73. SMITH,L.H.,HUGULEY,C.M.,BRAIN,J.A.:
Hereditary orotic aciduria.
The metabolic basis of inherited
desease. Edited by Stanbury,
D.S.p.1003,Mc.Graw-Hill,New York
(1972)

74. SMITH,L.H.,SULLIVAN,M.,HUGULEY,C.M.:
Pyrimidine metabolism in man,
IV, The enzymatic defect of
orotic aciduria.J.Clin.Invest.,
40: 656 (1961)

75. SWEENEY,M.I.,HOFFMAN,D.H.,POORE,G.A.:
Enzymes in pyrimidine biosynthesis.
Adv.Enzyme Regul., 9: 51 (1971)

76. WATTS,R.W.E.,WATTS,J.E.M.,SEEGMILLER,J.E.:
Xanthine oxidase activity in human
tissues and its inhibition by
allopurinol.J.Lab.clin.Med., 66: 688
(1965)

77. WYNGAARDEN,J.B.,ASHTON,D.M.:
The regulation of activity of
phosphoribosylpyrophosphate amido-
transferase by purine ribonukleoti-
des: A potential feed-back control
of purine biosynthesis.J.biol.chem.
234: 1492 (1959)

78. WYNGAARDEN,J.B.,KELLEY,W.N.:
Gout: The metabolic basis of inherited desease.Edited by Stanbury,D.S.p. 889, Mc.Graw-Hill, New-York (1972)

79. WYNGAARDEN,J.B.: Gout: Advances in metabolic disorders.Hrsg.Levine,R.Luft,2: (1965)

80. WYNGAARDEN,J.B.,RUNDLES,R.W.,METZ,E.N.:
Allopurinol in treatment of gout. Ann.intern.Med., 62: 842-847 (1965)

81. WYNGAARDEN,J.B.,RUNDLES,R.W.,SILBERMAN,H.R., HUNTER,S.:
Control of hyperuricemia with hydroxypyrazolonpyrimidine, a purine analoque, which inhibits urin acid synthesis. Arthr. and Rheum., 6: 306 (1963)

82. YÜ,T.F.,GUTMAN,A.B.:
Effect of allopurinol on serum and urinary uric acid in primary and secondary gout.Amer.J.Med., 37: 885 (1964)

83. ZÖLLNER,N.: Nukleinstoffwechsel, in: Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten, 2. Aufl. (Thieme), Stuttgart:5II (1957)

84. ZÖLLNER,N.: Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung. Normalwerte in der deutschen Bevölkerung.Z.klin.Chem.Biochem., 1: 178-182 (1963)

85. ZÖLLNER,N.: Die Behandlung der Gicht und der Uratnephrolithiasis mit Allopurinol.Verh.dtsch.Ges.inn.Med., 72: 781 (1966)

86. ZÖLLNER,N.,SCHATTENKIRCHNER,M.: Allopurinol in der Behandlung der Gicht und der Harnsäurennephrolithiasis.Dtsch.med.Wschr., 92: 654 (1967)

87. ZÖLLNER,N.: Die Gichtniere. Handbuch der inneren Medizin, Bd. 8, (Springer), Berlin: 77 (1968)

88. ZÖLLNER,N.,GRÖBNER,W.:
Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote. Europ.J.clin. Pharmacol., 3: 56 (1970)

89. ZÖLLNER,N.,GRÖBNER,W.:
Influence of oral ribonukleic acid on orotaciduria due to allopurinol administration.Z.ges.exp.Med., 156: 317 (1971)

90. ZÖLLNER,N.,GRIEBSCH,A.:
Influence of various dietary purines on uric acid production. Renal stone research, Madrid: 84-88 (1973)

91. ZÖLLNER,N.,JANSSEN,A.,GRÖBNER,W.:
Partielle Aufhebung der Allopurinol induzierten Orotacidurie durch Ribonukleotide.Verh. dtsch. Ges. inn.Med., 81: 1466 (1975)

92. ZÖLLNER,N.: Influence of diet on urinary uric acid excretion,in: Urolithiasis research,Plenum publishing, New York (1976)

93. ZÖLLNER,N.,GRÖBNER,W.:
Der Einfluß verschiedener Purin- und Pyrimidinnukleoside auf die Pyrimidinsynthese des Menschen.
Verh.dtsch.Ges.inn.Med.,
84: 1129 (1978)

Tabellarischer Lebenslauf

1951	geboren am 24. 9. 1951 als erstes Kind des Chirurgen Dr. med. Ernst Baumüller - Chefarzt des Knappschaftskrankenhauses Penzberg - und seiner Ehefrau Marie-Louise Baumüller, geb. Rommel
1957 - 62	Besuch der Volksschule in Icking und Penzberg
1962	Tod des Vaters am 21. 12. 1962
1962 - 72	Gymnasium:
zuerst:	Neusprachliches Gymnasium in Tutzing und Max-Josef-Stift in München
ab 1968	Musisches Gymnasium in München
1972	Abitur
WS 1972/73 bis SS 1974	3 Wartesemester - inzwischen Studium für das Realschullehramt (Physik, Chemie)
SS 1974	Zulassung zum Studium der Humanmedizin
1979	Heirat am 12. 1. 1979 mit Herrn Uwe Große, geb. 20. 1. 1952 in Berlin
1979	Ärztliche Approbation am 18. 5. 1979
seit August 1979	tätig als Assistenzärztin bei Prof. Peter am Institut für Anaesthesiologie der Ludwig Maximillians-Universität, München